

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-281222

(43)Date of publication of application : 10.10.2001

(51)Int.Cl.

G01N 27/62  
G01N 1/00  
G01N 27/64  
G01N 30/00  
G01N 30/72

(21)Application number : 2000-107220

(71)Applicant : CIPHERGEN BIOSYSTEMS INC

(22)Date of filing : 07.04.2000

(72)Inventor : PHAM THANG T

(30)Priority

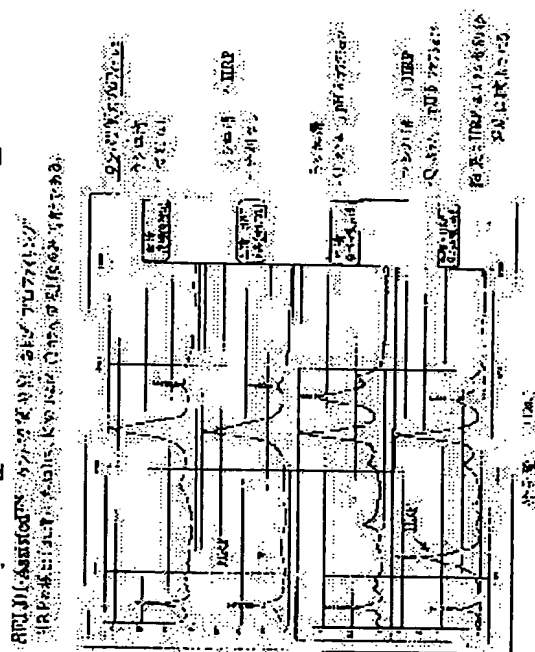
Priority number : 2000 190764 Priority date : 20.03.2000 Priority country : US

## (54) ANALYTICAL METHOD FOR OBJECT TO BE ANALYZED BY MASS SPECTROMETRY

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method in which an object, to be analyzed, as living-body molecules in a sample is separated.

**SOLUTION:** In the method, the object to be analyzed in the sample is separated by a gas-phase ion spectroscopic method. The method comprises a) a process which provides a probe for a gas-phase ion spectrometer, b) a process in which an adsorbent is brought into contact with the sample, in which the object to be analyzed can be bonded specifically to the adsorbent and in which the object to be analyzed can be bonded nonspecifically to the adsorbent, c) a process which provides a gas-phase spectrometer wherein a port which receives the probe is contained, an energy source which directs energy to the surface of the probe in order to adsorb, desorb and ionize the object to be analyzed is contained and a means used to detect the adsorbed, desorbed and ionized object, to be analyzed, which communicates with the surface of the probe, and d) a process in which the object, to be analyzed, bonded to the adsorbent is desorbed, adsorbed and ionized by the energy source by using the gas-phase ion spectrometer and in which the desorbed, adsorbed and ionized object to be analyzed is detected by using a detector so as to be separated.



[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.  
2.\*\*\* shows the word which can not be translated.  
3.In the drawings, any words are not translated.

## CLAIMS

**[Claim(s)]**

[Claim 1] This front face is a process which has the adsorbent combined there here including the substrate with which it is an approach for separating the analyte in a sample by gaseous-phase ion spectroscopy, is the process which offers the probe for a gaseous-phase ion spectrometer below, and this probe has a front face here;

b) Process which this adsorbent is contacted to this sample and enables both specification and association of non-specification to this adsorbent of this analyte;

c) The port for receiving this probe; process which offers a gaseous-phase spectrometer including the means for detecting the analyte which connected the analyte with energy source [ for turning energy to this front face ]; and this this probe front face that desorption was carried out and was ionized on this probe front face desorption and in order to ionize:

d) How to include the process which separates [ this analyte combined with this adsorbent ] this analyte for desorption and this analyte that desorption was carried out and was ionized by detecting using this detector by ionizing by this energy source using this gaseous-phase ion spectrometer.

[Claim 2] The approach according to claim 1 said gaseous-phase ion spectrometers are laser desorption / ionization mass spectrometer.

**[Claim 3]** The approach according to claim 2 of including further the process which applies an energy absorbing material to said probe after absorption of said analyte.

[Claim 4] The approach according to claim 1 said probe contains a hydrophilic adsorbent.

[Claim 5] The approach according to claim 4 said hydrophilic adsorbent contains silicon oxide.

**[Claim 6]** The approach according to claim 1 from which it is beforehand classified by steric exclusion chromatography and/or ion exchange chromatography before said sample contacts said adsorbent.

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the analytical method of the analyte which used mass analysis.

[0002]

[Description of the Prior Art] Mass analysis has spread increasingly as a proteinic analysis method. The spread is increasing by development of the approach of preventing the fragmentation of the protein in process which improves separation of the process of evaporation (for example, desorption) and ionization, and the protein in complicated sample mixture. Such an approach is indicated by U.S. Pat. No. 5,118,937 (Hillenkamp et al.), 5,617,060 (Hutchens and Yip), and WO 98/59360 (Hutchens and Yip).

[0003] The analysis method with which the protein by mass analysis was improved is required.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention offers the approach for separating the analyte of the biomolecule (bimolecular) in a sample. This approach is a process (this probe) which offers the probe for a gaseous-phase ion spectrometer. b sample is contacted to an adsorbent; containing the adsorbent combined with the substrate and front face which have a front face — The analyte in process; which makes specific and non-specific both sides stick to an adsorbent, and c sample The desorption from a front face, and the process to ionize, (For example, thing for which a sample is dried, without removing the uncombined analyte) And the process which detects desorption and the ionized analyte with a gaseous-phase ion spectrometer is included. In this way, a sample plays an active role in a desorption process, and is contacted with the front face which does not only function as one phase. The adsorbed analyte may be covered with the energy admolecule which subsequently promotes desorption. However, like [ in traditional MALDI ], before a sample is introduced into a probe, it is not mixed with energy adsorbate. In the specific embodiment, gaseous-phase ion spectrometers are laser desorption / ionization mass spectrometer in a mass spectrometer and a pan at a detail. An adsorbent is an adsorbent of the hydrophilic property which contains silicon oxide preferably. With other operation aspects, in order that the energy-absorbing matter may promote desorption and ionization, it is applied to a dried sample.

[0005] In other embodiments, a sample is classified, before being contacted with an adsorbent. For example, size judgment of the sample is carried out. Size judgment may be carried out with steric exclusion chromatography. Before a sample is introduced, it is classified by the affinity chromatography again. For example, a chromatography may be anion exchange, cation exchange, or an affinity chromatography. These approaches reduce the complexity of a sample and improve separation of the analyte.

[0006]

[Means for Solving the Problem] A front face is a process which has the adsorbent combined there here including the substrate with which this invention is an approach for separating the analyte in a sample by gaseous-phase ion spectroscopy, it is the process which offers the probe for a gaseous-phase ion spectrometer below, and a probe has a front face here.;

b) Process which an adsorbent is contacted to a sample and enables both specification and association of non-specification to the adsorbent of the analyte;

c) The port for receiving a probe; process which offers a gaseous-phase spectrometer including the means for detecting the analyte which connected the analyte with energy source [ for turning energy to a front face ]; and the probe front face which desorption was carried out and was ionized on the probe front face desorption and in order to ionize;

d) It is characterized by including the process which separates [ the analyte combined with the adsorbent ] the analyte for desorption and the analyte which desorption was carried out and was ionized by detecting using a detector by ionizing by the energy source using a gaseous-phase ion spectrometer, and the above-mentioned purpose is attained by that.

[0007] On one aspect of affairs of this invention, gaseous-phase ion spectrometers are laser desorption / ionization mass spectrometer.

[0008] On one aspect of affairs of this invention, the process which applies an energy absorbing material to a probe after absorption of the analyte is included further.

[0009] On one aspect of affairs of this invention, a probe contains a hydrophilic adsorbent.

[0010] On one aspect of affairs of this invention, a hydrophilic adsorbent contains silicon oxide.

[0011] On one aspect of affairs of this invention, by steric exclusion chromatography and/or ion exchange

chromatography, before a sample contacts an adsorbent, it is classified beforehand.

[0012]

[Embodiment of the Invention] (I. Definition) others — unless a definition is given, all the technical and scientific vocabulary used by this detail letter has the semantics usually understood by this contractor of the field to which this invention belongs. : which provides this contractor with the general definition of many vocabulary in which the following bibliographies are used by this invention — Singleton et al. — Dictionary Biology of (the 2nd edition) Microbiology and Molecular 1994; The Technology Cambridge (the volume on Walker —) Dictionary of Science and 1988; The Genetics Glossary (the 5th edition) of R. The volumes on Rieger, Springer Verlag(1991); and Hale&Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Unless it specifies by others so that it may be used on these specifications, the following vocabulary has the semantics based on these.

[0013] A "probe" means the equipment with which it can equip in the form which can be removed to a gaseous-phase analyzer, and the substrate which has the front face offered for detection of the analyte is contained. A probe may contain a single substrate or two or more single substrates. Since the probe of a specific class is meant, ProteinChip™, a ProteinChip™ array, or vocabulary like a chip is also used in this specification.

[0014] As for a "substrate" or a "probe substrate", an adsorbent says the thing of the solid phase which may be offered on it (for example, adhesion, deposition, etc.).

[0015] A "front face" means the external surface of a body or a substrate, or an up boundary.

[0016] A "strip" means the long and slender fragment of the ingredient which is flatness or a plane substantially.

[0017] A "plate" means substantially flush or the thing of the flake of an ingredient which is a plane, and it may be the suitable configuration of arbitration (for example, a rectangle, a square, an ellipse form, a round shape, etc.).

[0018] The thing of a substrate which essentially has a clearly larger, big front face than an parallel and small front face (for example, a strip or a plate) with "it is substantially flush" is said.

[0019] A "adsorbent" means the matter of arbitration which can adsorb the analyte. The vocabulary a "adsorbent" is this specification, and it is used in order to say the thing of both the single matter ("MONOPU REXX adsorbent") (for example, a compound or a functional group) with which the analyte is exposed, and the matter ("multiplexer adsorbent") with which the plurality to which the analyte is exposed differed. The adsorbent matter in a multiplexer adsorbent is mentioned as a "adsorbent kind." For example, the location in which the address on a probe substrate is possible may contain the multiplexer adsorbent characterized with the adsorbent kind (for example, the anion exchange matter, a metal chelating agent, or an antibody) with which many which have a different joint property differed. In itself [ substrate matter ], it can contribute to adsorption of the analyte again and may be regarded as some "adsorbents."

[0020] Before washing "adsorption" or "maintenance" by the eluate (selectivity threshold modifier) or the penetrant remover, it tells future either the thing of association which may be detected between an adsorbent and the analyte.

[0021] An "eluate" or a "penetrant remover" means the drugs which can be used since adsorption to the adsorbent of the analyte is mediated. An eluate and a penetrant remover are mentioned also as a "selectivity threshold modifier" again. Since the uncombined matter is washed and removed from a probe substrate front face, an eluate and a penetrant remover can be used.

[0022] "Specific association" means association which mainly intervenes by the criteria of gravitation over the specific analyte of an adsorbent. For example, the criteria of gravitation over the analyte of an anion exchange adsorption agent are the electrostatic attraction between positive charge and negative charge. So, an anion exchange adsorption agent is engaged in specific association with an electronegative charge kind. The criteria of gravitation over the analyte of a hydrophilic adsorbent are hydrogen bond. So, a hydrophilic adsorbent is electrically engaged in specific association with a polar kind etc.

[0023] "It dissociates", "separation", or "separation of the analyte" means detecting at least one analyte in a sample. Separation includes detecting and distinguishing by classifying two or more analyte in a sample, and distinguishing and detecting it following it. Separation does not need to classify the analyte from all other analyte in mixture completely. Judgment of the arbitration which distinguishes between at least two analyte rather is enough.

[0024] A sample is evaporated and a "gaseous-phase ion spectrometer" means the thing of the equipment which measures the parameter which may be changed into the mass-to-charge ratio of the generated ion when ionized. Generally, the target ion is electrified [ single ] and a mass-to-charge ratio is often only mentioned as mass. A gaseous-phase ion spectrometer contains a mass spectrometer, an ionic migration nature analyzer, and the equipment that measures all the ion currents.

[0025] A "mass spectrometer" means the gaseous-phase ion spectrometer which includes an inlet system, the source of ionization, an ion optics assembly, a mass spectrograph, and a detector.

[0026] A "laser-desorption-mass-spectrometry meter" means the mass spectrometer which carries out desorption of the analyte and uses laser as a means to evaporate and ionize.

[0027] It says identifying existence of the object detected saying "it detects", nonexistence, or an amount.

[0028] The "biological matter" means the matter of the arbitration originating in a living thing, an organ, an organization, a cell, or a virus. This contains biological liquids, such as saliva, blood, urine, lymph, succus prostaticus or sperm, and a milky lotion, and the extracts (for example, a cell extract, a cell culture medium, a judgment sample, etc.) of such arbitration.

[0029] A "living body organic molecule" means the organic molecule typically made by the living body. This contains the molecule containing a nucleotide, amino acid, sugar, a fatty acid, a steroid, a nucleic acid, a polypeptide, a

carbohydrate, lipids, and such combination (for example, a glycoprotein, ribonucleoprotein, a lipoprotein).

[0030] A "energy-absorbing molecule" or "EAM" absorbs energy from an energy source in a mass spectrometer, and means the molecule which makes desorption of the analyte possible from a probe front face by it. The energy-absorbing molecule used in MALDI is often mentioned as a "matrix." A cinnamic-acid derivative, a sinapic acid, and dihydroxybenzoic acid are frequently used as a energy-absorbing molecule in the laser desorption of a living body organic molecule. Refer to U.S. Pat. No. 5,719,060 (Hutchens&Yip) as the further publication of a energy-absorbing molecule.

[0031] (Probe which has an II. biotechnology-chromatography front face) The approach of this invention is enforced by the probe attached for a gaseous-phase ion spectrometer. A probe has a front face and includes the substrate to which the front face adhered and the adsorbent which can combine the analyte alternatively.

[0032] (A. Substrate) It can equip with the probe of this invention in the form which can be removed to a gaseous-phase ion spectrometer. For example, a substrate may be the configuration of a strip of having an adsorbent on the front face. A probe may be the configuration of arbitration as long as it can equip in the form which can be removed to a gaseous-phase ion spectrometer. This may contain a rectangle or a circular probe.

[0033] A probe may suit use with the detector of an inlet system and a gaseous-phase ion spectrometer again. For example, a probe may suit so that it may mount on \*\*\*\* movable to a horizontal direction, a perpendicular direction, and/or a hand of cut, and this \*\*\*\* moves a probe to the location which continues without needing relocation of the probe by the hand.

[0034] A probe substrate is made from the matter which can support an adsorbent preferably. For example, although the probe substrate matter may include an insulating material (for example, glass, a ceramic), a half-insulating material (for example, silicon wafer) or the conductive matter (for example, nickel, brass, steel, aluminum, gold, or a conductive polymer), organic polymers, or such combination, it is not limited to these.

[0035] A probe substrate front face may be in the condition which combines the analyte. for example, in the one embodiment, the front face of a probe substrate may be in the condition (it is for example, like chemical or rough surface finish — mechanical) for arranging an adsorbent on a front face. An adsorbent contains the functional group for combining with the analyte. In some the embodiments, it can contribute to the property of itself and an adsorbent, and the substrate matter may be regarded as some "adsorbents."

[0036] An adsorbent may be arranged by continuation or the discontinuous pattern at a probe substrate. When continuous, the adsorbent more than a kind may be arranged on a substrate front face. When the adsorbent of two or more molds is used, the coat of the substrate front face may be carried out so that the joint property more than a kind may change with 1 or two-dimensional inclination. When discontinuous, two or more adsorbents may be arranged in the location (for example, the address is possible by the laser beam of a mass spectrometer) in which the predetermined address on a substrate front face is possible. Although the location in which the address is possible may be arranged by the pattern of arbitration, it is desirable that they are a straight line, an orthogonal array, or a regular pattern like a regular curve (for example, circle). The location in which each address is possible may contain the same or a different adsorbent. The probe containing the adsorbent of a discontinuous spot is shown by drawing 1. A spot is "possible [ the address ]" in case an energy source like laser is turned between mass analysis, or in order to carry out desorption of the analyte, it carries out the "address" of the spot.

[0037] A probe can be manufactured using the suitable approach of arbitration depending on selection of the substrate matter and/or an adsorbent. For example, the coat of the front face of a metal substrate can be carried out by the matter which permits derivatization (derivitization) of a surface of metal. Furthermore, the coat of the surface of metal can be carried out to a detail with silicon oxide, titanium oxide, or gold. Subsequently, a front face may be induction-ized by the linker of 2 functional-group nature, and covalent bond of the end may be carried out to a front face by the functional group, and end of one of the two may already be further induction-ized by the radical which functions as an adsorbent. Since an adsorbent for the porous silicon front face produced from crystalline silicon to combine the analyte is included, it may be chemically embellished with other examples. In the example of further others, the adsorbent which has a hydrogel frame can form in a substrate front face directly by carrying out the polymerization of the monomer solution containing those derivatives that contain a permutation acrylamide monomer, a permutation acrylate monomer, or the functional group chosen as an adsorbent, for example by INSAICHU.

[0038] The suitable probe used for this invention is indicated by U.S. Pat. No. 5,617,060 (Hutchens and Yip) and WO 98/59360 (Hutchens and Yip) again.

[0039] (B. Adsorbent) An adsorbent is matter which combines the analyte. The front face of the substrate which forms a probe adheres to these. Two or more adsorbents may be used by the approach of this invention. A different adsorbent can show a greatly different joint property, a different different joint property a little, or a delicately different joint property.

[0040] Typically, as for the adsorbent in which a greatly different joint property is shown, criteria of gravitation differ from the format of an interaction. Generally criteria of gravitation are the function of chemical or biological molecular recognition. The criteria of the attraction between an adsorbent and the analyte For example, (1) salt promotion interaction, For example, hydrophobic interaction, sulfur good nature interaction, and fixed coloring matter interaction; (2) hydrogen bond and/or a Van-der-Waals-force interaction, And a charge transfer interaction (it is (for example, like [ in the case of a hydrophilic interaction ])); (3) electrostatic interaction (For example, the combination of capacity [ of the analyte which forms the metal ion and coordinate covalent bond (namely, coordinated complex formation) of an ionic charge interaction especially positivity, or electronegative ionic charge

interaction; (4) adsorbent ], or said two interactions or more of a format is included.) That is, an adsorbent can show the criteria of two or more attraction, therefore is well-known as a "mixed functional-group nature" adsorbent.

[0041] (1. Salt promotion interaction adsorbent) A useful adsorbent contains a hydrophobic interaction adsorbent in observing a salt promotion interaction.

[0042] The example of a hydrophobic interaction adsorbent includes the matrix which has matrix; which has aliphatic hydrocarbon, especially C1 - C18 aliphatic hydrocarbon, and an aromatic hydrocarbon functional group like a phenyl group.

[0043] Another useful adsorbent contains a sulfur good nature interaction adsorbent (it is (for example, like T-GEL (trademark) which is one kind of the sulfur good nature adsorbent marketed from Pierce, Rockford, and Illinois)) in observing a salt promotion interaction.

[0044] The third adsorbent also containing a salt promotion ionic interaction and a hydrophobic interaction contains a fixed coloring matter interaction adsorbent. A fixed coloring matter interaction adsorbent includes the matrix of fixed (it is (for example, like available CIBACHRON™ blue from Pharmacia Biotech, Piscataway, and New Jersey)) coloring matter.

[0045] (a. Opposition adsorbent-aliphatic hydrocarbon) One useful opposition adsorbent is Ciphergen. They are Biosystems and H4 canal chip (C16) available from Inc. (Palo Alto, CA). This H4 canal chip contains C16 chain fixed by the upper part of silicon oxide (SiO<sub>2</sub>) as an adsorbent on a substrate front face.

[0046] (2. Hydrophilic interaction adsorbent) A useful adsorbent includes the front face containing a normal phase adsorbent like silicon oxide (for example, glass) in observing hydrogen bond and/or Van der Waals force on the criteria of a hydrophilic interaction. A normal phase or a silicon oxide front face acts as a functional group. Furthermore, the adsorbent containing the front face embellished with a hydrophilic polymer like a polyethylene glycol, a dextran, agarose, or a cellulose may function as a hydrophilic interaction adsorbent again. Almost all protein combines a hydrophilic interaction adsorbent for the radical of the amino acid residue (namely, hydrophilic amino acid residue) combined through a hydrophilic interaction including hydrogen bond or Van der Waals force, or combination.

[0047] (a. Normal phase adsorbent-silicon oxide) One useful hydrophilic adsorbent is Ciphergen. They are Biosystems and a normal phase chip available from Inc. (Palo Alto, CA). This normal phase chip contains silicon oxide (SiO<sub>2</sub>) as an adsorbent on a substrate front face. Silicon oxide may be applied to a front face by many common knowledge approaches of arbitration. These approaches include vacuum evaporation (for example, spatter coating). The thickness with such a desirable probe is about 9000Å.

[0048] (3. Electrostatic interaction adsorbent) An adsorbent useful in order to observe electrostatic or an ionic charge interaction contains an anionic adsorbent like the matrix (namely, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) of for example, a sulfuric-acid anion and a carboxylate anion matrix (namely, COO<sup>-</sup>), or a phosphate anion (OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>). The electric charge of the matrix which has a sulfuric-acid anion is permanently carried out to negative. However, the matrix which has a carboxylate anion has a negative charge only by larger pH than electric dissociation exponent of that. By pH of under this electric dissociation exponent, this matrix shows a neutral charge substantially. A suitable anionic adsorbent contains the anionic adsorbent which is the matrix which has the combination of a sulfuric-acid anion, a carboxylate anion, and a phosphate anion again.

[0049] Other adsorbents useful in order to observe electrostatic or an ionic charge interaction contain a cationic adsorbent. The matrix of the 2nd class, the 3rd class, or the 4th class amine is mentioned as the specific example of a cationic adsorbent. The electric charge of the 4th class amine is just carried out permanently. However, the 2nd class and tertiary amine have a charge depending on pH. By pH of under electric dissociation exponent, the electric charge of the 2nd class and the tertiary amine is just carried out, and the electric charge of them is carried out to negative by larger pH than those electric dissociation exponents. A suitable cationic adsorbent contains the cationic adsorbent which is the matrix which has the combination of the 2nd different class, the 3rd class, and the 4th class amine again.

[0050] To use the mixed ionicity adsorbent of a format which often contains both an anion and a cation in the case of an ionic interaction adsorbent (anionic and cationic both) may be wished. Such an adsorbent offers the buffer capacity which continued as a function of pH.

[0051] Moreover, a dipole-dipole interaction adsorbent is mentioned, and although this interaction is electrostatic, the usual protein donator or usual acceptor in which a charge or titration is possible is not included in other adsorbents (this is useful in order to observe an electrostatic interaction).

[0052] (a. Anionic adsorbent) One useful adsorbent is Palo. Ciphergen of Alto and CA Biosystems, SAX1 manufactured by Inc. It is an anionic adsorbent like ProteinChip™. A SAX1 protein chip is manufactured from a SiO<sub>2</sub> coating aluminum substrate. In this process, the suspension of the 4th class ammonium polystyrene microsphere in distilled water (polystyrenemicrospheres) is deposited on the front face of this chip (1mL / spot, 2 times). After an air-drying (a room temperature, 5 minutes), by deionized water, the rinse of this chip is carried out and an air-drying is again carried out (a room temperature, 5 minutes).

[0053] (b. Cationic adsorbent) One useful adsorbent is Palo. Ciphergen of Alto and CA Biosystems, SCX1 manufactured by Inc. It is a cationic adsorbent like ProteinChip™. A SCX1 protein chip is manufactured from a SiO<sub>2</sub> coating aluminum substrate. In this process, the suspension of the sulfonate polystyrene microsphere in distilled water is deposited on the front face of this chip (1mL / spot, 2 times). After an air-drying (a room temperature, 5 minutes), by deionized water, the rinse of this chip is carried out and an air-drying is again carried

out (a room temperature, 5 minutes).

[0054] (4. Coordination share interaction adsorption) The matrix which has bivalence and trivalent metal ion is mentioned to an adsorbent useful in order to observe the capacity which forms a metal ion and coordinate covalent bond. The matrix of the fixed metal ion chelating agent offers the fixed synthetic organic molecule, this has one or more electron donative groups, and this electron donative group forms the foundation of a coordination share interaction with transition-metals ion. Oxygen, nitrogen, and sulfur are mentioned to the main electron donative groups which function as a fixed metal ion chelating agent. This metal ion produces the metal ion complex which has the part in which it combined with the fixed metal ion chelating agent, consequently remained in the analysis lifter for [ some of ] the interaction with an electron donative group. Generally transition-metals ion (for example, other metal ions like copper, nickel, cobalt, zinc, iron, aluminum, and calcium) is mentioned to a suitable metal ion.

[0055] (a. Nickel chelate adsorbent) Another useful adsorbent is a Kinzou chelate adsorbent like IMAC3 (nitrilotriacetic acid on Immobilized Metal Affinity Capture and a front face) chip (this is available from CIPHERGEN Biosystems and Inc. again). Photopolymerization of the :5-methyl amide-2-(N and N-bis-carboxy meta-ylamino) pentanoic acid [ with which this chip is manufactured as follows ] (7.5wt%), acryloyl tree (hydroxymethyl) monomethylamine (7.5wt%) and N, and N'-methylenebis acrylamide (0.4wt%) is carried out as a photoinitiator using - (-) riboflavin (0.02wt%). A monomer solution is etched coarsely, and is deposited on the substrate by which glass coating was carried out (0.4mL, two times), and is irradiated for 5 minutes using a \*\* UV exposure system (they are 20 mW/cm<sup>2</sup> at an Hg short arc lamp and 365nm). This front face is washed by the sodium chloride solution (1M), and, subsequently is washed twice by deionized water.

[0056] IMAC3 which has nickel (II) is activated as follows. This front face is processed with the solution (50mM, 10mL / spot) of NiSO<sub>4</sub>, and is mixed for 10 minutes by the high-frequency mixer. After removing NiSO<sub>4</sub> solution, this treatment process is repeated. Finally, this front face is washed by the flow of deionized water (15 second / chip).

[0057] (5. Enzyme activity part interaction adsorbent) A protease (for example, trypsin), phosphatase, a kinase, and nuclease are mentioned to an adsorbent useful in order to observe an enzyme activity part joint interaction. This interaction is an array specific interaction of the enzyme binding site on the analyte (typically biopolymer) which has a catalyst binding site in an enzyme.

[0058] (6. Reversibility share interaction adsorbent) A disulfide exchange interaction adsorbent is mentioned to an adsorbent useful in order to observe a reversibility share interaction. The adsorbent containing the fixed sulfhydryl group (for example, mercaptoethanol or fixed dithiothreitol (dithiothreitol)) is mentioned to a disulfide exchange interaction adsorbent. This interaction is due to formation of the share disulfide bond between an adsorbent and the cysteine residue put to the solvent of an analysis lifter. Such an adsorbent is combined with the protein or the peptide which has a nucleic acid containing the base changed so that cysteine residue and the returned sulfur compound might be included.

[0059] (7. Glycoprotein interaction adsorbent) A glycoprotein interaction adsorbent is mentioned to an adsorbent useful in order to observe a glycoprotein interaction, for example, these adsorbents have the lectin (namely, protein which has an oligosaccharide) (this example is CONCONAVALINTM) fixed there, and this is Phaemacia. Biotech offPiscataway, New It is marketed from Jersey. Such an adsorbent functions based on an interaction including the molecular recognition of the carbohydrate part on a macromolecule.

[0060] (8. Living body specific interaction adsorbent) Generally an adsorbent useful in order to observe a living body specific interaction is called a "living body specific compatibility adsorbent." the case where it of adsorption is alternative and compatibility (an equilibrium dissociation constant, K<sub>d</sub>) is at least to 10<sup>-3</sup>M- (for example, 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-9</sup>M) — a living body — it is considered that it is specific. The adsorbent of the arbitration which interacts with specific biomolecule specifically and is combined is mentioned as the example of a living body specific compatibility adsorbent. The antibody by which the following is mentioned to a living body specific compatibility adsorbent and of which immobilization was done (this is combined with an antigen); Fixed DNA (this is combined with DNA-binding protein), DNA and RNA; the fixed substrate or inhibitor (these) Protein and; combined with an enzyme — fixed ligand (this is combined with receptor); of which drugs (this is combined with drugs binding protein); immobilization was done — fixed RNA (this DNA) of which receptor (this is combined with ligand); immobilization was done and; combined with RNA binding protein — the fixed avidin or the phospholipid film of which streptoavidin (these are combined with biotin and biotin-ized molecule); immobilization was done, and a vesicle (these are combined with lipid binding protein).

[0061] (III. sample preparation) The sample used for this invention may be the source origin of a biological ingredient of arbitration. Body fluid (for example, blood, a blood serum, saliva, urine, succus prostaticus, sperm, etc.) is mentioned to this. The extract of the biological sample origins (for example, a cell melt, a cell culture medium, etc.) is mentioned to it again. Preferably, this sample is a liquid gestalt and the solid material is removed.

[0062] This sample may be directly applied to the adsorbent on the front face of a probe. Or this sample may be classified before use. Since judgment decreases the complexity of the analyte in a sample, it is useful. This sample may be classified by the well-known approach of useful arbitration, in order to separate biomolecule. Separation may be based on magnitude by gel exclusion chromatography, gel electrophoresis and film dialysis, or ultra-centrifugal separation. HPLC is a useful approach. Separation may be based on hydrophobicity (for example, one to C18 resin), or a compatibility method (an immunoaffinity, the fixed metal, DNA, coloring matter) being based [ obtaining (for example, an anion or a cation exchange chromatography) and ] on the charge held by the analyte again. Crystallization and precipitate may be mentioned to other approaches of judgment.



[0063] These approaches combine in another embodiment. This sample is classified by steric exclusion chromatography then an anion, or the cation exchange chromatography in the example in a desirable embodiment.

[0064] This sample is contacted with the adsorbent on a probe substrate. Subsequently, this sample is dried on an adsorbent. Consequently, both specification and the adsorption of non-specification of the analyte in a sample are brought about with this adsorbent, without flushing the analyte which is not combined with an adsorbent. Generally, the capacity (the analyte of 100 picomoles is contained from number ATTOMORU in 500microl from about 1microl) of a sample is enough in order to combine with this adsorbent.

[0065] After the analyte is applied to a probe and drying, it is detected using gaseous-phase ion spectroscopy. The analyte or other matter which were combined with the adsorbent on a probe may be analyzed using a gaseous-phase ion spectrometer. The amount and property of this analyte may be measured using gaseous-phase ion spectroscopy. In addition to the target analyte, other matter may be detected by gaseous-phase ion spectroscopy (for example, laser desorption ionization mass spectrometry).

[0066] (IV. gaseous-phase ion spectroscopy)

(A. Gaseous-phase ion spectroscopy detection) In a desirable embodiment, this analyte is detected by the laser-desorption-mass-spectrometry method. A laser desorption mass spectrometry includes the process which gives the analyte on a probe front face to the laser energy source, and this laser energy source carries out desorption of the analyte from a probe front face, and it is ionized. Subsequently, desorption is carried out and this ionized analyte is detected. Subsequently, an energy absorption molecule (for example, inside of a solution) may be applied to other matter combined on the analyte or a probe substrate front face. A spray, pipetting, or dipping may be used.

[0067] In one embodiment, a mass spectrometer may be used in order to detect the analyte on a probe. In a typical mass spectrometer, the probe which has the analyte is introduced in the inlet-port system of a mass spectrometer. Subsequently, desorption of the analyte is carried out by the source of desorption (for example, laser, a high-speed atomic collision, or high energy plasma). It is generated, and desorption is carried out, the kind which volatilized consists of the ion or neutral object formed beforehand, and these are ionized as a direct result of a desorption event. The generated ion is collected by the ion optics assembly, and, subsequently a mass spectrograph scatters about for it and analyzes passage ion. The ion which comes out of a mass spectrograph is detected by the detector. Subsequently, a detector changes the information on the ion detected to the mass pair charge ratio. Typically, detection of the existence of the analyte or other matter includes detection of signal reinforcement. Next, this may reflect the amount and property of the analyte which are combined with a probe.

[0068] In a desirable embodiment, a laser desorption time-of-flight mass spectrometer is used with the probe of this invention. In a laser desorption mass spectrometry, the probe which has the united analyte is introduced in an inlet-port system. Desorption of this analyte is carried out, and it is ionized by laser from the source of ionization to a gaseous phase. It is collected by the ion optics assembly, and, subsequently ion is accelerated through short high electric field in a time-of-flight mass spectrograph, and it is washed away by this generated ion to a high vacuum chamber. At the edge which the high vacuum chamber left, this accelerated ion collides with a front face by high sensitivity detection by different time amount. Since time of flight is the function of the mass of ion, the time amount in which it passed between the ion detector collisions with ion formation may be used in order to identify specific existence of a molecule or the nonexistence of mass to charge ratio. these components of the arbitration of a laser desorption time-of-flight mass spectrometer combine with other components indicated by this detail letter in the assembly of a mass spectrometer, and various means, such as desorption, acceleration, detection, and measurement of time amount, are used for this mass spectrometer so that this contractor may understand.

[0069] Nitrogen laser can be used for a typical laser-desorption-mass-spectrometry meter in 337.1nm. Useful pulse width is 4 nanoseconds. Generally, the output of about 1-25microJ is used.

[0070] It sets in the another embodiment, and an ionic mobility analyzer may be used in order to detect and characterize and to carry out the analyte. The principle of an ionic mobility analysis method is based on the mobility from which ion differs. The ion of the sample generated by ionization passes along the tube which contains a gas under the effect of electric field, and, specifically, moves it at a different rate (originating in the difference (for example, mass, a charge, or a configuration)). This ion is registered with a detector (with gestalt which is a current typically), and subsequently, these may be used in order to identify the analyte or other matter of a sample. One advantage of an ionic mobility analysis method is being able to operate it with atmospheric pressure.

[0071] Moreover, it sets in the another embodiment, and all ion current measuring devices may be used in order to detect and characterize and to carry out the analyte. This equipment may be used when it has the surface chemistry matter with which a probe combines only the analyte of a single mold. When the analyte of a single mold combines with a probe, all the currents generated from the ionized analyte reflect the property of the analyte. Subsequently, all the ion currents generated by the analyte may be compared with all the ion currents where the well-known compound was saved. Subsequently, the description of this analyte may be determined.

[0072] (B. Data analysis) The data produced from the desorption of the analyte and detection can be analyzed using a programmable digital computer. Generally this computer program contains the medium which saves a code and which can be read. A fixed code may be given to memory including the quality of the same of the adsorbent in arrangement of each property on a probe, and its property, and the elution conditions used for washing the adsorbent. This program can identify the set of the property on the probe which subsequently specifies the property (for example, type of the adsorbent and eluate (eluant) to be used) of fixed selectivity using this information. This computer contains the data of the reinforcement of the signal in the code received as an input, and various molecular weight received from the location in which the specific address on a probe is possible again. This data can

show the detected analysis significant work (signal reinforcement and the determined molecular weight are included about each detected analyte if needed).

[0073] Data analysis includes the process which determines the signal reinforcement (for example, height of a peak) of the detected analyte, and the process which removes "what is outside" (data which deviated from predetermined statistical distribution). For example, the observed peak may be standardized and, as for a process, the height of each peak over a certain reference is calculated by this. For example, reference may be a background noise produced with an instrument and a chemical (for example, molecule which absorbs energy), and sets this as zero in the scale. Subsequently, the signal reinforcement detected about each analyte or other substrates can be expressed as a desired scale (for example, 100) with the gestalt of relative intensity. Or a criterion may be held with a sample and can calculate the relative intensity of the signal observed about the analyte by which each analyte or others was detected by this, using the peak from the criterion as reference.

[0074] This computer can change into various formats for a display the data obtained as a result. In a certain format, although called "a spectrum Fig. or a retentate (retentate) map", a standard spectrum Fig. may be displayed and the drawing shows the amount of the analyte which reaches a detector in each specific molecular weight here. In another format, although called a "peak map", only the information on a peak height and mass is maintained from a spectrum Fig., a clearer image is given, and the analyte of the almost same molecular weight is seen more easily. In still more nearly another format, although called a "gel Fig.", each mass from a peak Fig. is changed, and it becomes a gray-scale image based on the height of each peak, and becomes an appearance similar to the band in electrophoresis gel as a result. In still more nearly another format, although called "3-D overlay", some spectrums can pile up and the delicate change in a relative peak height can be studied by this. In still more nearly another format, although called a "difference (difference) map Fig.", two or the spectrum beyond it may be compared and the upper part or the analyte adjusted caudad is conveniently displayed between the analyte of a proper, and a sample (highlight). The analyte profile (spectrum) from two samples of arbitration may be compared visually.

[0075] (V. Detection of the marker in example-bovine serum (horseradish peroxidase)) The protein in the blood serum sample of a different individual can be expressed in a different format. A protein chip technique is used with protein separation method, and accommodation or the protein adjusted caudad is detected up in these samples.

[0076] The thing which added the protein marker (horseradish peroxidase-HRP) in low concentration (under 0.5% all protein) in the experiment at bovine serum, and the thing which is not added were used for profiling. The profile of these [ before protein judgment ] two samples was compared, and HRP was detected. Refer to two traces on drawing 2.

[0077] It is K30 size selection (this separates protein lower than 15kD from thing higher than 30kD(s)) spin column, and subsequently it is Q-anion exchanger (strong anion exchanger) spin column, and these two samples are classified. Each of these spin columns is Ciphergen. It is available from Biosystems and Inc. The spin column which achieves a similar function is common knowledge in the field concerned, and is marketed from other manufacturers. The profile of the protein in a column fraction is carried out, and HRP is detected. Two traces under drawing 2 show this result. A protocol is as stating below substantially.

[0078] (A. Protein judgment by K30 size selection spin column) 5M NaCl and 1%Triton stock are used and it is 0.4M about a blood serum or a melt (higher than about 5mg [ /ml ] protein or it). NaCl and 0.01%(v/v) Triton It adjusts so that it may have X-100. About 10% dilution of the original sample is ideal. It often mixes and incubates for 20 minutes by refrigeration.

[0079] About the aliquot of the sample of 30microL, it is 20mM. It applies to the size exclusion spin column made into the equilibrium of pH9.0 in Tris-HCl. The continuing protocol is pursued for a size selection spin column.

[0080] (1. Storage buffer-solution exchange)

1. Break the outlet cap of a spin column. This column is inserted in 1.5-ml tubing (in addition, 2-ml tubing is good).

[0081] 2. Open the top cap of the spin column. The storage buffer solution is made to flow into tubing with gravity. When the storage buffer solution does not fall easily, a column and a tubing unit are struck several times on a hard field, or it applies to a centrifuge for several seconds by 3000rpm.

[0082] 3. The storage buffer solution (for example, PBS) is discharged with gravity until a drop stops coming out further. The tubing is emptied.

[0083] 4. Apply the buffer solution (for example, 20mM Tris-HCl (pH9.0)) of about 0.75ml request to the column, and pass it through a column matrix with gravity. This process is repeated twice [ further ] and it is made for the 3 times as much new buffer solution as column volume to pass at least.

[0084] (2. Protein purification protocol)

1. Break the outlet cap of a spin column. The column is inserted in 1.5-ml tubing (in addition, 2-ml tubing is good). The top cap of the spin column is opened.

[0085] 2. Carry out centrifugal separation of the spin column in 3 minutes and in a desk centrifugal separation machine by abbreviation 700xg (about 3000 rpm). If the storage buffer solution eluted in tubing touches the outlet edge of that column, that tubing will be emptied and this centrifugal separation process will be repeated once again. It is caudad filled up with a column matrix, and although it must be made to half-dry, it should not divide.

[0086] 3. Move the spin column to new 1.5-ml tubing (or the storage buffer solution is completely emptied from the first tubing). Don't apply the protein sample of 20-30ul to the core of the column matrix with which it was filled up slowly, and don't pass the sample to the flank of the column matrix.

[0087] 4. Carry out at-long-intervals alignment separation by about 700xg for 3 minutes. Refined protein is put into recovery tubing.

- [0088] 5. Arbitration : in order to collect the protein which decreases gradually in a continuous fraction, repeat the two above-mentioned process with the application of the buffer solution of 25ul aliquot.
- [0089] 6. Move a column to new tubing and they are 20mM(s) of 30microL Tris-HCl (pH9.0) is applied. 30microL which is the sum total of four fractions was collected for every sample using the buffer solution equilibrated in the column.
- [0090] (B. Protein judgment by Q anion exchanger spin column) The fractions 1 and 2 of K30 column are doubled. 20mM(s) The volume is adjusted to 100microL using Tris-HCl (pH9.0). It often mixes and incubates for 5 minutes by refrigeration.
- [0091] About the sample of 100microL, it is 20mM. It applies to the strong anion exchanger spin column (for example, Ciphergen Biosystems, the "Q" column from Inc.) equilibrated in Tris-HCl (pH9.0). The protocol is pursued for a strong anion exchanger spin column. : (1. storage buffer-solution exchange)
1. Break the outlet cap of a spin column. The column is inserted in 1.5-ml tubing (in addition, 2-ml tubing is good).
- [0092] 2. Open the top cap of the spin column. The storage buffer solution is made to flow into the tubing with gravity. The storage buffer solution falls easily, if there is nothing, the column and a tubing unit will be struck several times on a hard front face, or centrifugal separation will be carried out for about 20 seconds by 1000rpm.
- [0093] 3. The storage buffer solution is made to discharge with gravity until a drop stops coming out further. The buffer solution in the tubing is emptied.
- [0094] 4. Apply the joint buffer solution of about 0.5ml request to the column, and pass a column matrix for it with gravity. This process is repeated twice [ further ] and it is made for the at least 10 times as much new buffer solution as column volume to pass that resin.
- [0095] (2. Protein judgment / purification protocol)
- (a. Purification of a protein sample)
1. A protein sample must be made into the same buffer-solution conditions as what was used for equilibration of an anion exchanger spin column.
- [0096] 2. If a sample includes an advanced salt or pH (it differs from the joint buffer solution) buffered too much, buffer-solution exchange of these must be first carried out on the size selection spin column (K-3 or K-30) equilibrated by the joint buffer solution.
- [0097] 3. If samples are buffer-solution conditions similar to the joint buffer solution, subsequently those samples can be diluted 10 times (10x) using the joint buffer solution.
- [0098] (b. Protein judgment on Q anion exchanger spin column)
1. Break the outlet cap of a spin column. The column is inserted in 1.5-ml tubing (in addition, 2-ml tubing is good). The top cap of the spin column is opened.
- [0099] 2. Carry out centrifugal separation of the spin column with a desk centrifugal separation vessel for [ for / 20 seconds / - ] 1 minute by 1000rpm (about 80xg). It is caudad filled up with the column matrix, and although it must half-dry, it should not divide.
- [0100] 3. Move the spin column to new 1.5-ml tubing (or the storage buffer solution is completely emptied from the first tubing). The anion exchange resin is passed for the sample with gravity until it applies the protein sample (adjusted in the joint buffer solution) of 20-500ul focusing on the crowning of the column matrix with which it filled up and a drop stops coming out from a column to several minute room or a pan.
- [0101] 4. Carry out at-long-intervals alignment separation by 1000rpm for 1 minute. The protein (fraction number 1) collected in this first recovery tubing is not combined with that column. On this joint buffer-solution condition, these are neutrality or it is because there may be capacity which has the charge of forward net or flows out of a column.
- [0102] 5. Arbitration : in order to maximize capture of a up to [ a proteinic anion exchange resin ], an eluate is again applied to the column and the last two processes may be followed.
- [0103] 6. Move the column to the second tubing. The joint buffer solution of 100ul(s) washes the column. At-long-intervals alignment separation is carried out by 1000rpm for 1 minute. The fraction number 2 is stored.
- [0104] 7. Move the column to the third tubing. The elution buffer solution A of 100-200ul is applied, and it is left for about 1 minute. At-long-intervals alignment separation is carried out by 1000rpm for 1 minute. The fraction number 3 is stored.
- [0105] 8. Move the column to the fourth tubing. The elution buffer solution B of 100-200ul is applied, and it is left for about 1 minute. At-long-intervals alignment separation is carried out by 1000rpm for 1 minute. The fraction number 4 is stored.
- [0106] 9. Continue this process about the continuing elution buffer solution.
- [0107] 10. Subsequently carry out the profile of the protein in these fractions with a SELDITMPBS reader using the array of hydrophobic H4 or a normal phase.
- [0108] The elution buffer solution changes typically according to the buffer solution (for example, Tris, sodium acetate, sodium phosphate) and buffer-solution reinforcement (for example, 20mM-50mM). The useful buffer solution is 20-50mM. Tris, salt concentration, and pH are included.
- [0109] At-long-intervals alignment separation of the column is carried out by 1000rpm for 1 minute. Flow is again applied to the same column and proteinic association is maximized. Centrifugal separation of the column is carried out for 1 minute by 1000rpm. This is the fraction of pH9.
- [0110] A column is moved to new tubing and they are 20mM(s) of 100microL Tris-HCl (pH9.0) is applied to the column resin. At-long-intervals alignment separation of the column is carried out by 1000rpm for 1 minute. This is pH9 washing fraction. This can be doubled with pH9 fraction.

[0111] A column is moved to new tubing and they are 20mM(s) of 100microL Tris-HCl (pH8.0) is applied to the column resin. It applies so that the buffer solution may move some pressures in a column crowning slowly through the resin, and it incubates for 5 minutes at a room temperature. At-long-intervals alignment separation of the column is carried out by 1000rpm for 1 minute. This is pH8 fraction.

[0112] The process of a number 8 is repeated about other elution buffer solutions (low pH).

[0113] (C. Protein on a SELDI chip) Ciphergen It was used in order to carry out the profile of the protein in the fraction generated by the spin column in Biosystems and the normal phase chip from Inc. The opposition H4 hydrophobic chip (more nearly available than Ciphergen Biosystems and Inc.) was used for the fraction which contains high-concentration NaCl especially.

[0114] 1microl aliquot of each fraction was deposited on the spot on a normal phase chip, and dried the sample at the room temperature for about 5 minutes. The same sample of the further capacity is applied to the same spot, and may be dried. The sample deposited on H4 chip should be washed twice by the water of 5microl, before making it dry.

[0115] The saturation sinapic acid (SPA) of 0.5microl in 50% acetonitrile +0.25%TFA was applied to each spot. The chip was dried for 5 minutes at the room temperature. The 0.5microl saturation SPA sinapic acid in a 50% acetonitrile +0.25%TFA solution which is the 2nd aliquot was applied.

[0116] (D. Data capture and protein profile analysis) About each chip, it is Protein. Biology System It read in Ciphergen Biosystems and Inc. with I (PBSI) reading vessel.

[0117] Automatic mode was used for data collection (SELDI quantum setup). Two sets of a protein profile are collected (one is low laser reinforcement and another is high laser reinforcement).

[0118] The protein profile from a different melt was compared using SELDI software. The protein in which the difference was shown was detected.

[0119] This invention offers the new ingredient and new approach for analyzing the biomolecule analyte in a sample. Although a specific example is offered, the above-mentioned publication is instantiation and is not limited. One or more descriptions of the arbitration of the above-mentioned embodiment may be combined in one or more descriptions of other embodiments of the arbitration of this invention, and the format of arbitration. Furthermore, the alteration of much this inventions will become clear to this contractor, if this specification is read. Therefore, with reference to the attached claim, the range of this invention is not only determined with reference to the above-mentioned publication, but should be determined along range where those equivalence is sufficient.

[0120] The whole is used even for the range as a thing as each publication of each or a patent document separately indicated to be where all the publications and patent documents which are quoted in this specification are the same as reference for all the purposes. By the citation of the various reference in this specification, an applicant does not admit being the "advanced technology" of this invention about specific reference of arbitration.

[0121] This invention offers an approach for mass analysis to analyze the analyte in a sample. This approach includes the process which classifies a sample beforehand with size exclusion and/or ion exchange chromatography, the process which applies a sample to the adsorbent to which the front face of a mass analysis probe adhered, and the process which enables both the specification and the adsorption of non-specification to the adsorbent of the analyte (for example, thing for which a sample is dried, without washing in order to remove an uncombined sample). Subsequently, the energy-absorbing matter is added to the dried sample, and this sample is analyzed according to laser desorption / ionization mass spectrometry.

[0122]

[Effect of the Invention] By this invention, the approach for separating the analyte of the biomolecule in a sample is offered. This approach is a process (this probe) which offers the probe for a gaseous-phase ion spectrometer. b sample is contacted to an adsorbent; containing the adsorbent combined with the substrate and front face which have a front face — The analyte in process; which makes specific and non-specific both sides stick to an adsorbent, and c sample The desorption from a front face, and the process to ionize, (For example, thing for which a sample is dried, without removing the uncombined analyte) And the process which detects desorption and the ionized analyte with a gaseous-phase ion spectrometer is included. If the approach by this invention is used, the complexity of a sample will decrease and separation of the analyte will improve.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing 1 shows the probe which includes the discontinuous spot of a substrate 101 and an adsorbent 102. It can equip with a probe in the form which can be removed to a gaseous-phase ion spectrometer. The address is possible for each spot by the energy source for carrying out desorption of the analyte.

[Drawing 2] Drawing 2 shows detection of different minute amount protein (horseradish peroxidase) which exists in both two samples henceforth by the approach of this invention a fraction and before detecting. The bovine serum spiked by bovine serum and horseradish peroxidase was first turned directly to the adsorbent front face by SELDI. Two upper minute amount protein shows that a marker must have been detected by the spike sample. Subsequently, both samples were continuously classified by the strong anion exchange spin chromatography with the size exclusion spin chromatography. Subsequently the sample was observed by SELDI on the adsorbent front face. In this case, although a marker may be clearly detected by the spike sample, it is not detected by the non-spiking sample.

---

[Translation done.]

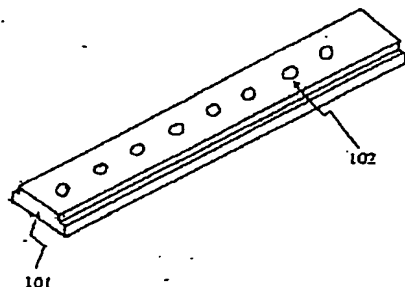
## \* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

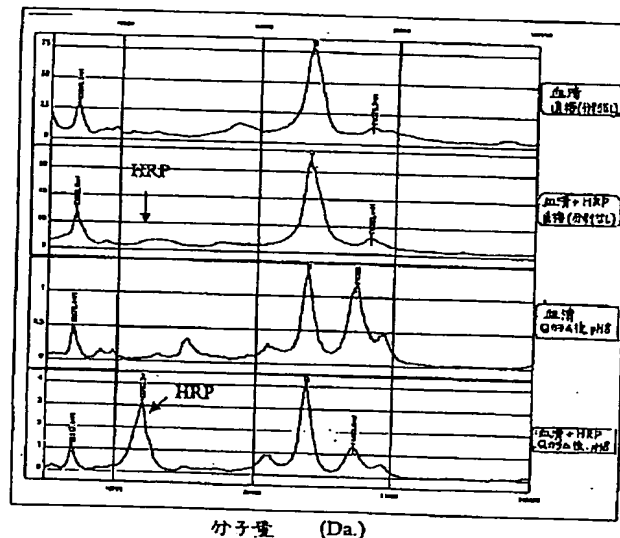
## DRAWINGS

[Drawing 1]



[Drawing 2]

SELDI-Assisted™ タンパク質分別 および フロフアイリンク  
 HRPの検出(血清に添加)は、K30 および Q カラム 分別後のみ可能である。



## タンパク質のプロファイル

血清

- 分別なし

血清 + HRP

- 分別なし

血清

- Q カラム, pH 8 7575m

血清 + HRP

- Q カラム, pH 8 7575m

結果: HRPはカラム分別後、  
容易に検出される

[Translation done.]



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中の分析物を気相イオン分光法によって分離するための方法であって、以下：

a) 気相イオン分光計のためのプローブを提供する工程であって、ここで該プローブは表面を有する基板を含み、ここで該表面はそこに結合された吸着剤を有する、工程；

b) 該吸着剤を該サンプルと接触させ、該分析物の該吸着剤への特定のおよび非特定の結合の両方を可能にする工程；

c) 該プローブを受容するためのポート；該プローブ表面上で分析物を脱着およびイオン化するためにエネルギーを該表面に向けるためのエネルギー源；および該脱着され、イオン化された、該プローブ表面と連絡した分析物を検出するための手段、を含む気相分光計を提供する工程；

d) 該吸着剤に結合された該分析物を、該気相イオン分光計を用いて、該分析物を該エネルギー源で脱着およびイオン化し、そして該脱着され、イオン化された分析物を該検出器を用いて検出することによって、分離する工程を包含する方法。

【請求項2】 前記気相イオン分光計が、レーザー脱着／イオン化質量分光計である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記分析物の吸収後に、エネルギー吸収物質を前記プローブに適用する工程をさらに包含する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記プローブが親水性吸着剤を含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記親水性吸着剤が酸化ケイ素を含有する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記サンプルが、サイズ排除クロマトグラフィーおよび／またはイオン交換クロマトグラフィーによって、前記吸着剤と接触する前にあらかじめ分別される、請求項1に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、質量分析を用いた分析物の分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】質量分析は、タンパク質の分析法として益々普及している。その普及は、気化（例えば、脱着）およびイオン化の工程ならびに複雑な試料混合物中のタンパク質の分離を改善する工程中のタンパク質のフラグメンテーションを防止する方法の開発により増加している。そのような方法は、例えば、米国特許第5,118,937号（Hillenkampら）、同第5,617,060号（HutchensおよびYip）およびWO98/59360（HutchensおよびYip）に記載されている。

【0003】質量分析によるタンパク質の改良された分

析法が必要である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、試料中の生体分子（bimolecular）の分析物を分離するための方法を提供する。この方法は、a) 気相イオン分光計のためのプローブを提供する工程（このプローブは、表面を有する基板および表面に結合した吸着剤を含有する）；b) 試料を吸着剤に接触させ、（例えば、非結合の分析物を除去することなく試料を乾燥させることにより）吸着剤に特定のおよび非特定の双方の吸着をさせる工程；ならびにc) 試料中の分析物を表面から脱着およびイオン化する工程、ならびに脱着、イオン化された分析物を気相イオン分光計で検出する工程を包含する。こうして試料は、脱着工程において活発な役割を果たし、単に一つの段階としては機能しない表面と接触される。吸着された分析物は、次いで脱着を促進するエネルギー吸着分子に覆われ得る。しかしながら試料は、伝統的なMALDIの場合のように、プローブに導入される前にエネルギー吸着物質と混合されない。特定の実施態様では、気相イオン分光計は、質量分析計、さらに詳細にはレーザー脱着／イオン化質量分析計である。吸着剤は、好ましくはシリコンオキシドを含有する親水性の吸着剤である。他の実施態様では、エネルギー吸収物質が脱着およびイオン化を促進するため乾燥試料に適用される。

【0005】他の実施態様では、試料は、吸着剤と接触される前に分別される。例えば、試料はサイズ分別される。サイズ分別は、例えばサイズ排除クロマトグラフィーで実施され得る。試料はまた、導入される前にアフィニティクロマトグラフィーにより分別される。例えば、クロマトグラフィーは、アニオン交換、カチオン交換またはアフィニティクロマトグラフィーであり得る。これらの方法は、試料の複雑さを減らし、分析物の分離を改善する。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、サンプル中の分析物を気相イオン分光法によって分離するための方法であって、以下：

a) 気相イオン分光計のためのプローブを提供する工程であって、ここでプローブは表面を有する基板を含み、ここで表面はそこに結合された吸着剤を有する、工程；b) 吸着剤をサンプルと接触させ、分析物の吸着剤への特定のおよび非特定の結合の両方を可能にする工程；

c) プローブを受容するためのポート；プローブ表面上で分析物を脱着およびイオン化するためにエネルギーを表面に向けるためのエネルギー源；および脱着され、イオン化された、プローブ表面と連絡した分析物を検出するための手段、を含む気相分光計を提供する工程；

d) 吸着剤に結合された分析物を、気相イオン分光計を用いて、分析物をエネルギー源で脱着およびイオン化



し、そして脱着され、イオン化された分析物を検出器を用いて検出することによって、分離する工程を包含することを特徴とし、そのことにより、上記目的が達成される。

【0007】本発明の一つの局面では、気相イオン分光計が、レーザー脱着／イオン化質量分光計である。

【0008】本発明の一つの局面では、分析物の吸収後に、エネルギー吸収物質をプローブに適用する工程をさらに包含する。

【0009】本発明の一つの局面では、プローブが親水性吸着剤を含有する。

【0010】本発明の一つの局面では、親水性吸着剤が酸化ケイ素を含有する。

【0011】本発明の一つの局面では、サンプルが、サイズ排除クロマトグラフィーおよび／またはイオン交換クロマトグラフィーによって、吸着剤と接触する前にあらかじめ分別される。

【0012】

【発明の実施の形態】(1. 定義) 他で定義しない限り、本明細書中で使用される全ての技術的および科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解される意味を有する。以下の参考文献は、本発明で使用する多くの用語の一般的な定義を当業者に提供する：Singletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第2版、1994)；The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker編、1988)；The Glossary of Genetics (第5版、R. Riegerら編)、Springer Verlag (1991)；およびHale&Marham、The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で 사용되는ように、他で特定しない限り以下の用語はこれらに基づく意味を有する。

【0013】「プローブ」とは、気相分析計に取り外しできる形で装着可能な装置のことを言い、分析物の検出のために提供される表面を有する基板を含有する。プローブは、単一の基板または複数の基板を含み得る。ProteinChip™、ProteinChip™アレイまたはチップのような用語もまた、特定の種類のプローブを意味するために本明細書中で使用される。

【0014】「基板」または「プローブ基板」とは、吸着剤が(例えば、付着、堆積などにより)その上に提供され得る固相のことを言う。

【0015】「表面」とは、本体または基板の外表面または上部境界のことを言う。

【0016】「ストリップ」とは、実質的に平坦または平面状である材料の細長い断片のことを言う。

【0017】「プレート」とは、実質的に平坦または平面状である材料の薄片のことを言い、任意の適切な形状(例えば、長方形、正方形、楕円形、円形など)であり得る。

【0018】「実質的に平坦」とは、本質的に平行であり、小さい表面(例えば、ストリップまたはプレート)よりは明らかに大きい、大きな表面を有する基板のことを言う。

【0019】「吸着剤」とは、分析物を吸着し得る任意の物質のことを言う。「吸着剤」という用語は、本明細書で、分析物が曝露される単一の物質(「モノプレックス吸着剤」)(例えば、化合物または官能基)、および分析物が曝露される複数の異なった物質(「マルチプレックス吸着剤」)の両方のことを言うために使用される。マルチプレックス吸着剤中の吸着剤物質は、「吸着剤種」として言及される。例えば、プローブ基板上的アドレス可能な位置は、異なった結合特性を有する多くの異なった吸着剤種(例えば、アニオン交換物質、金属キレート剤または抗体)により特徴づけられるマルチプレックス吸着剤を含み得る。基板物質それ自体は、また分析物の吸着に寄与し得、「吸着剤」の一部とみなされ得る。

【0020】「吸着」または「保持」とは、溶離液(選択性閾値調節剤)または洗浄液で洗浄される以前または以後のいずれかに、吸着剤と分析物の間に検出され得る結合のことを言う。

【0021】「溶離液」または「洗浄液」とは、分析物の吸着剤への吸着を仲介するため使用できる薬剤のことを言う。溶離液および洗浄液はまた、「選択性閾値調節剤」としても言及される。溶離液および洗浄液は、プローブ基板表面から非結合物質を洗浄し、除去するため使用できる。

【0022】「特定の結合」とは、吸着剤の特定の分析物に対する引力の基準により主として介在される結合のことを言う。例えば、アニオン交換吸着剤の分析物に対する引力の基準は、陽電荷と陰電荷の間の静電的な引力である。それゆえ、アニオン交換吸着剤は、陰性電荷種との特定の結合に携わる。親水性吸着剤の分析物に対する引力の基準は、水素結合である。それゆえ、親水性吸着剤は、電気的に極性種などとの特定の結合に携わる。

【0023】「分離する」、「分離」または「分析物の分離」とは、試料中の少なくとも1つの分析物を検出することを言う。分離は、試料中の複数の分析物を、分別しそれに続いて区別して検出することにより、検出および区別することを含む。分離は、混合物中の他の全ての分析物から分析物を完全に分別することを必要としない。むしろ、少なくとも2つの分析物の間を区別する任意の分別で十分である。

【0024】「気相イオン分光計」とは、試料が気化されそしてイオン化されたときに、生成したイオンの質量

一電荷比に変換され得るパラメーターを測定する装置のことを言う。一般に、目的のイオンは単一の電荷を帯び、質量-電荷比はしばしば単に質量として言及される。気相イオン分光計は、例えば質量分析計、イオン移動性分析計、および全イオン電流を測定する装置を含む。

【0025】「質量分析計」とは、注入口システム、イオン化源、イオン光学アセンブリ、質量分析器および検出器を包含する気相イオン分光計のことを言う。

【0026】「レーザー脱着質量分析計」とは、分析物を脱着し、気化し、そしてイオン化する手段としてレーザーを使用する質量分析計のことを言う。

【0027】「検出する」とは、検出される対象の存在、非存在または量を同定することを言う。

【0028】「生物学的物質」とは、生物、器官、組織、細胞またはウイルスに由来する任意の物質のことを言う。これは、唾液、血液、尿、リンパ液、前立腺液または精液、乳液などのような生物学的な液体、ならびにこれらの任意の抽出物（例えば、細胞抽出物、細胞培養培地、分別試料など）を含む。

【0029】「生体有機分子」とは、典型的には生体により作られる有機分子のことを言う。これは、例えばヌクレオチド、アミノ酸、糖、脂肪酸、ステロイド、核酸、ポリペプチド、炭水化物、脂質、これらの組み合わせ（例えば、糖タンパク質、リボ核タンパク質、リボタンパク質）を含有する分子を含む。

【0030】「エネルギー吸収分子」または「EAM」とは、質量分析計中でエネルギー源からエネルギーを吸収し、それによってプローブ表面から分析物の脱着を可能とする分子のことを言う。MALDIにおいて使用されるエネルギー吸収分子は、しばしば「マトリックス」として言及される。ケイ皮酸誘導体、シナピン酸およびジヒドロキシ安息香酸は、生体有機分子のレーザー脱着におけるエネルギー吸収分子として頻繁に使用される。エネルギー吸収分子のさらなる記載として米国特許第5,719,060号(Hutchens & Yip)を参照せよ。

【0031】(11. バイオクロマトグラフィー表面を有するプローブ) 本発明の方法は、気相イオン分光計のため取り付けられるプローブに実施される。プローブは、表面を有し、そして表面に付着された基板、分析物を選択的に結合できる吸着剤を包含する。

【0032】(A. 基板) 本発明のプローブは、気相イオン分光計に取り外しできる形で装着可能である。例えば、基板は、その表面に吸着剤を有するストリップの形状であり得る。プローブは、気相イオン分光計に取り外しできる形で装着可能である限り、任意の形状であり得る。これは、例えば長方形または円形のプローブを含む得る。

【0033】プローブはまた、注入口システムおよび気

相イオン分光計の検出器での使用に適合され得る。例えば、プローブは、水平方向、垂直方向および/または回転方向に移動可能な台架にマウントするように適合され得、この台架は手によるプローブの再配置を必要とすることなく連続する位置にプローブを移動する。

【0034】プローブ基板は、好ましくは吸着剤を支持できる物質から作られる。例えば、プローブ基板物質は、絶縁物質（例えば、ガラス、セラミック）、半絶縁物質（例えば、シリコンウェハ）もしくは導電性物質（例えば、ニッケル、黄銅、銅、アルミニウム、金または導電性ポリマー）、有機ポリマーまたはこれらの組み合わせを含み得るが、これらに限定されない。

【0035】プローブ基板表面は、分析物を結合する状態であり得る。例えば、ひとつの実施態様では、プローブ基板の表面は、吸着剤を表面に配置するための（例えば、化学的、または荒面仕上のような機械的な）状態であり得る。吸着剤は、分析物と結合するための官能基を含む。いくつかの実施態様では、基板物質はそれ自体、また吸着剤の特性に寄与し得、そして「吸着剤」の一部としてみなされ得る。

【0036】吸着剤は、連続または非連続パターンでプローブ基板に配置され得る。連続的な場合、一種以上の吸着剤が基板表面上に配置され得る。複数型の吸着剤が使用される場合、基板表面は、一種以上の結合特性が1または2次元勾配で変化するようにコートされ得る。非連続の場合、複数の吸着剤が基板表面上の所定のアドレス可能な位置（例えば、質量分析計のレーザービームによりアドレス可能）に配置され得る。アドレス可能な位置は、任意のパターンで配列され得るが、直線、直交配列、または規則的なカーブ（例えば、円）のような規則的なパターンであることが好ましい。各アドレス可能な位置は、同一または異なった吸着剤を含み得る。図1では、非連続的なスポットの吸着剤を含むプローブが示される。スポットは、質量分析の間に、レーザーのようなエネルギー源が向けられる際に「アドレス可能」であり、または分析物を脱着するためにスポットを「アドレス」する。

【0037】プローブは、基板物質および/または吸着剤の選択に依存して任意の適切な方法を使用して製造し得る。例えば、金属基板の表面は、金属表面の誘導体化(derivitization)を許容する物質でコートし得る。さらに詳細には、金属表面は、シリコンオキシド、酸化チタンまたは金でコートし得る。次いで、表面は、二官能基性のリンカーで誘導化され得、その一端は表面に官能基で共有結合され得、そしてそのもう片方の一端は吸着剤として機能する基でさらに誘導化され得る。他の実施例では、結晶性シリコンから産生される多孔性シリコン表面が分析物を結合するための吸着剤を含むため化学的に修飾され得る。さらに他の実施例では、例えば、置換アクリルアミドモノマー、置換アクリ

レートモノマー、または吸着剤として選択した官能基を含むそれらの誘導体を含むモノマー溶液をインサイチュで重合することにより、ヒドロゲル骨格を有する吸着剤が基板表面に直接形成し得る。

【0038】本発明に使用される適切なブローブはまた、例えば米国特許第5,617,060号(HutchensおよびYip)およびWO98/59360(HutchensおよびYip)に記載される。

【0039】(B. 吸着剤) 吸着剤は、分析物を結合する物質である。これらは、ブローブを形成する基板の表面に付着される。複数の吸着剤が本発明の方法で使用され得る。異なる吸着剤は、大きく異なった結合特性、幾分異なった異なった結合特性、または微妙に異なった結合特性を示し得る。

【0040】大きく異なった結合特性を示す吸着剤は、典型的には、引力の基準または相互作用の様式が異なる。引力の基準は、一般に化学的または生物学的な分子認識の機能である。吸着剤と分析物の間の引力の基準は、例えば(1)塩促進相互作用、例えば、疎水的相互作用、硫黄好性相互作用、および固定化色素相互作用；

(2) 水素結合および/またはファンデルワールス力相互作用、および電荷移動相互作用(例えば、親水性相互作用の場合のような)；(3) 静電的相互作用(例えば、イオン電荷相互作用、特に陽性または陰性イオン電荷相互作用)；(4) 吸着剤の金属イオンと配位共有結合(すなわち、配位錯体形成)を形成する分析物の能力；または2つ以上の前記様式の相互作用の組み合わせを含む。すなわち、吸着剤は2つ以上の引力の基準を示すことができ、従って「混合官能基性」吸着剤として公知である。

【0041】(1. 塩促進相互作用吸着剤) 塩促進相互作用を観察するのに有用な吸着剤は、疎水的相互作用吸着剤を含む。

【0042】疎水的相互作用吸着剤の例は、脂肪族炭化水素、特にC1~C18脂肪族炭化水素を有するマトリックス；およびフェニル基のような芳香族炭化水素官能基を有するマトリックスを含む。

【0043】塩促進相互作用を観測するのに有用な別の吸着剤は、硫黄好性相互作用吸着剤(例えば、Pierce, Rockford, Illinoisから市販される硫黄好性吸着剤の一種類であるT-GEL(登録商標)のような)を含む。

【0044】塩促進イオン相互作用および疎水的相互作用もまた含有する第三の吸着剤は、固定化色素相互作用吸着剤を含む。固定化色素相互作用吸着剤は、(例えば、Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jerseyから入手可能なCIBACHRON™ブルーのような)固定化色素のマトリックスを含む。

【0045】(a. 逆相吸着剤-脂肪族炭化水素) ひと

つの有用な逆相吸着剤は、Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto, CA) から入手可能な疎水的な(C16)H4チップである。この疎水的なH4チップは、基板表面上の吸着剤としてシリコンオキシド( $\text{SiO}_2$ )の上部に固定化されたC16鎖を含む。

【0046】(2. 親水性相互作用吸着剤) 水素結合および/またはファンデルワールス力を親水性相互作用の基準で観察するのに有用な吸着剤は、シリコンオキシド(例えば、ガラス)のような順相吸着剤を含有する表面を含む。順相またはシリコンオキシド表面は、官能基として作用する。さらに、ポリエチレングリコール、デキストラン、アガロースまたはセルロースのような親水性ポリマーで修飾された表面を含有する吸着剤はまた、親水性相互作用吸着剤として機能し得る。殆どのタンパク質は、水素結合またはファンデルワールス力を含む親水性相互作用を介して結合するアミノ酸残基(すなわち、親水性アミノ酸残基)の基または組み合わせのため、親水性相互作用吸着剤を結合する。

【0047】(a. 順相吸着剤-シリコンオキシド) ひとつの有用な親水性吸着剤は、Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto, CA) から入手可能な順相チップである。この順相チップは、基板表面上の吸着剤としてシリコンオキシド( $\text{SiO}_2$ )を含む。シリコンオキシドは、任意の多くの周知方法により表面に適用され得る。これらの方法は、例えば蒸着(例えば、スパッターコーティング)を含む。そのようなブローブの好ましい厚さは、約9000オングストロームである。

【0048】(3. 静電的相互作用吸着剤) 静電的またはイオン電荷相互作用を観測するために有用である吸着剤は、例えば、硫酸アニオンのマトリックス(すなわち、 $\text{SO}_4^{2-}$ )およびカルボキシレートアニオンマトリックス(すなわち、 $\text{COO}^-$ )またはホスフェートアニオン( $\text{OPO}_3^{2-}$ )のようなアニオン性吸着剤を含む。硫酸アニオンを有するマトリックスは、永続的に負に荷電される。しかしながら、カルボキシレートアニオンを有するマトリックスは、その $\text{pKa}$ より大きい $\text{pH}$ でのみ負電荷を有する。この $\text{pKa}$ 未満の $\text{pH}$ では、このマトリックスは、実質的に中性電荷を示す。適切なアニオン性吸着剤はまた、硫酸アニオンおよびカルボキシレートアニオンおよびホスフェートアニオンの組み合わせを有するマトリックスであるアニオン性吸着剤を含む。

【0049】静電的またはイオン電荷相互作用を観測するために有用である他の吸着剤は、カチオン性吸着剤を含む。カチオン性吸着剤の特定の例には、第2級、第3級または第4級アミンのマトリックスが挙げられる。第4級アミンは永続的に正に荷電される。しかしながら、第2級および第3級アミンは、 $\text{pH}$ に依存する電荷を有する。 $\text{pKa}$ 未満の $\text{pH}$ では、第2級および第3級アミ

ンは正に荷電され、そしてそれらの $pK_a$ より大きい $pH$ では、それらは負に荷電される。適切なカチオン性吸着剤はまた、異なる第2級、第3級、および第4級アミンの組み合わせを有するマトリックスであるカチオン性吸着剤を含む。

【0050】イオン相互作用吸着剤（アニオン性およびカチオン性の両方）の場合において、しばしばアニオンおよびカチオンの両方を含む混合した様式のイオン性吸着剤を使用することが所望され得る。このような吸着剤は、 $pH$ の機能として連続した緩衝能力を提供する。

【0051】また他の吸着剤（これは静電的相互作用を観測するために有用である）には、双極子-双極子相互作用吸着剤が挙げられ、この相互作用は、静電的であるが通常の電荷または滴定可能なタンパク質供与体または受容体は含まれない。

【0052】(a. アニオン性吸着剤) 1つの有用な吸着剤は、Palo Alto, CAのCiphergen Biosystems, Inc. によって製造されるSAX1 ProteinChip™のようなアニオン性吸着剤である。SAX1タンパク質チップは $SiO_2$ コーティングアルミニウム基板から製造される。このプロセスにおいて、蒸留水中の第4級アンモニウムポリスチレンミクロスフィア (polystyrenemicrospheres) の懸濁液は、このチップの表面上に堆積される (1 mL/スポット、2回)。空気乾燥後 (室温、5分)、このチップは、脱イオン水でリンスされ、再び空気乾燥される (室温、5分)。

【0053】(b. カチオン性吸着剤) 1つの有用な吸着剤は、Palo Alto, CAのCiphergen Biosystems, Inc. によって製造されるSCX1 ProteinChip™のようなカチオン性吸着剤である。SCX1タンパク質チップは $SiO_2$ コーティングアルミニウム基板から製造される。このプロセスにおいて、蒸留水中のスルホネートポリスチレンミクロスフィアの懸濁液は、このチップの表面上に堆積される (1 mL/スポット、2回)。空気乾燥後 (室温、5分)、このチップは、脱イオン水でリンスされ、再び空気乾燥される (室温、5分)。

【0054】(4. 配位共有相互作用吸着) 金属イオンと配位共有結合を形成する能力を観測するために有用である吸着剤には、例えば、二価および三価金属イオンを有するマトリックスが挙げられる。固定された金属イオンキレート剤のマトリックスは、固定された合成有機分子を提供し、これは1つ以上の電子供与基を有し、この電子供与基は、遷移金属イオンとの配位共有相互作用の基礎を形成する。固定された金属イオンキレート剤として機能する主要な電子供与基には、酸素、窒素、およびイオウが挙げられる。この金属イオンは、固定された金属イオンキレート剤に結合し、その結果、分析物上に電子供与基との相互作用のためのいくつかの残った部分を

有する金属イオン錯体を生じる。適切な金属イオンには、遷移金属イオン (例えば、銅、ニッケル、コバルト、亜鉛、鉄、ならびにアルミニウムおよびカルシウムのような他の金属イオン) が一般的に挙げられる。

【0055】(a. ニッケルキレート吸着剤) 別の有用な吸着剤は、IMAC3 (Immobilized Metal Affinity Capture、表面上のニトリロ三酢酸) チップ (これはまたCiphergen Biosystems, Inc. から入手可能) のような金属キレート吸着剤である。このチップは、以下のように製造される: 5-メタシルアミド-2-(N, N-ビスカルボキシメチルアミノ) ペンタン酸 (7.5 wt%)、アクリロイルトリ-(ヒドロキシメチル) メチルアミン (7.5 wt%) およびN, N'-メチレンビスアクリルアミド (0.4 wt%) は、光開始剤として(-) リボフラビン (0.02 wt%) を使用して光重合される。モノマー溶液は、粗くエッチングされ、ガラスコーティングされた基板上に堆積され (0.4 mL、2回)、そして5分間、近UV露光システム (Hg ショートアークランプ、365 nmで20 mW/cm<sup>2</sup>) を用いて照射される。この表面は、塩化ナトリウム溶液 (1 M) で洗浄され、次いで脱イオン水で2回洗浄される。

【0056】Ni(II) を有するIMAC3は、以下のように活性化される。この表面は、NiSO<sub>4</sub>の溶液 (50 mM、10 mL/スポット) で処理され、そして高周波数ミキサーで10分間混合される。NiSO<sub>4</sub>溶液を除去した後、この処理プロセスが繰り返される。最後に、この表面は、脱イオン水の流れて洗浄される (15秒/チップ)。

【0057】(5. 酵素活性部位相互作用吸着剤) 酵素活性部位結合相互作用を観測するために有用である吸着剤には、プロテアーゼ (例えば、トリプシン)、ホスファターゼ、キナーゼおよびヌクレアーゼが挙げられる。この相互作用は、酵素における触媒結合部位を有する分析物 (代表的には生体高分子) 上の酵素結合部位の配列特異的相互作用である。

【0058】(6. 可逆性共有相互作用吸着剤) 可逆性共有相互作用を観測するために有用である吸着剤には、ジスルフィド交換相互作用吸着剤が挙げられる。ジスルフィド交換相互作用吸着剤には、固定されたスルフヒドリル基 (例えば、メルカプトエタノールまたは固定されたジチオトレイトール (dithiothrieto l)) を含む吸着剤が挙げられる。この相互作用は、吸着剤と分析物上の溶媒に曝されたシステイン残基との間の共有ジスルフィド結合の形成に基づく。このような吸着剤は、システイン残基および還元されたイオウ化合物を含むように改変された塩基を含む核酸を有するタンパク質またはペプチドと結合する。

【0059】(7. 糖タンパク質相互作用吸着剤) 糖タ

ンパク質相互作用を観測するために有用である吸着剤には、糖タンパク質相互作用吸着剤が挙げられ、例えばこれらの吸着剤はそこに固定されたレクチン（すなわち、オリゴ糖を有するタンパク質）（この例は、CONCO NAVAL INTMである）を有し、これはPharmacia Biotech of Piscataway, New Jerseyから市販されている。このような吸着剤は、巨大分子上の炭水化物部分の分子認識を含む相互作用に基づいて機能する。

【0060】（8. 生体特異的相互作用吸着剤）生体特異的相互作用を観測するために有用である吸着剤は、一般に「生体特異的親和性吸着剤」と呼ばれる。吸着は、それが選択的であり、そして親和性（平衡解離定数、 $K_d$ ）が少なくとも $10^{-3}M$ （例えば、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-5}M$ ）までである場合、生体特異的であると見なされる。生体特異的親和性吸着剤の例には、特定の生体分子と特異的に相互作用しかつ結合する任意の吸着剤が挙げられる。生体特異的親和性吸着剤には、例えば以下が挙げられる：固定された抗体（これは抗原に結合する）；固定されたDNA（これはDNA結合タンパク質に結合する）、DNA、およびRNA；固定された基質またはインヒビター（これらは、タンパク質および酵素に結合する）；固定された薬剤（これは薬剤結合タンパク質に結合する）；固定されたリガンド（これはレセプターに結合する）；固定されたレセプター（これはリガンドに結合する）；固定されたRNA（これはDNAおよびRNA結合タンパク質に結合する）；固定されたアビジンまたはストレプトアビジン（これらはビオチンおよびビオチン化分子に結合する）；固定されたリン脂質膜およびベシクル（これらは脂質結合タンパク質に結合する）。

【0061】（111. 試料調製）本発明に使用される試料は、任意の生物学的材料源由来であり得る。これには、体液（例えば、血液、血清、唾液、尿、前立腺液、精液など）が挙げられる。それにはまた、生物学的試料（例えば、細胞溶解物、細胞培養地など）由来の抽出物が挙げられる。好ましくは、この試料は液体形態であり、そして固体材料は除去されている。

【0062】この試料は、ブローブ表面の吸着剤に直接適用され得る。あるいは、この試料は、使用前に分別され得る。分別は、試料中の分析物の複雑さを減少するので有用である。この試料は、生体分子を分離するために有用な任意の公知の方法によって分別され得る。分離は、例えば、ゲル排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動および膜透析または超遠心分離によって大きさに基づき得る。HPLCは、有用な方法である。分離はまた、分析物によって保有される電荷に基づき得る（例えば、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー）か、または疎水性（例えば、C1-18樹脂）または親和性法（免疫親和性、固定した金属、DNA、色素）に基づ

き得る。分別の他の方法には、例えば結晶化および沈殿が挙げ得られる。

【0063】別の実施態様において、これらの方法が組み合わされ得る。好ましい実施態様における例では、この試料は、サイズ排除クロマトグラフィー、続いてアニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィーによって分別される。

【0064】この試料は、ブローブ基板の吸着剤と接触される。次いで、この試料は、吸着剤上で乾燥される。この結果、吸着剤に結合されない分析物を洗い流すことなく、この吸着剤によって試料中の分析物の特定のおよび非特定の吸着の両方をもたらす。一般的に、試料の容量（約 $1\mu l$ から $500\mu l$ 中で数アットモルから $100$ ピコモルの分析物を含有する）は、この吸着剤に結合するために十分である。

【0065】分析物がブローブに適用されそして乾燥された後、気相イオン分光法を使用して検出される。ブローブ上の吸着剤に結合された分析物または他の物質は、気相イオン分光計を使用して分析され得る。この分析物の量および特性は、気相イオン分光法を使用して測定され得る。目的の分析物に加えて他の物質もまた、気相イオン分光法（例えば、レーザー脱着イオン化質量分析法）によって検出され得る。

【0066】（IV. 気相イオン分光法）

（A. 気相イオン分光法検出）好ましい実施態様において、この分析物は、レーザー脱着質量分析法によって検出される。レーザー脱着質量分析法は、レーザーエネルギー源に対してブローブ表面上に分析物を与える工程を包含し、このレーザーエネルギー源は、ブローブ表面から分析物を脱着し、そしてそれをイオン化する。次いで、この脱着されそしてイオン化された分析物は検出される。次いで、エネルギー吸収分子（例えば、溶液中）は、分析物またはブローブ基板表面上に結合した他の物質に適用され得る。スプレー、ビベッティングまたはディッピングが使用され得る。

【0067】1つの実施態様において、質量分析計は、ブローブ上の分析物を検出するために使用され得る。典型的な質量分析計において、分析物を有するブローブは、質量分析計の入口システムへ導入される。次いで分析物は、脱着源（例えば、レーザー、高速原子衝突、または高エネルギープラズマ）によって脱着される。発生され、脱着され、揮発された種は、予め形成されたイオンまたは中性物からなり、これらは脱着事象の直接の結果としてイオン化される。発生したイオンは、イオン光学アセンブリによって収集され、次いで質量分析器は通過イオンを散乱し、そして分析する。質量分析器を出るイオンは検出器によって検出される。次いで検出器は、質量対電荷比へ検出したイオンの情報を変換する。分析物または他の物質の存在の検出は、典型的には、シグナル強度の検出を包含する。次に、このことは、ブローブ

に結合する分析物の量および特性を反映し得る。

【0068】好ましい実施態様において、レーザー脱着飛行時間質量分析計は本発明のプローブと共に使用される。レーザー脱着質量分析法において、結合した分析物を有するプローブは、入口システムへ導入される。この分析物は脱着され、そしてイオン化源からレーザーによって気相へイオン化される。この発生したイオンは、イオン光学アセンブリによって収集され、次いで飛行時間質量分析器において、イオンが短い高電場を介して加速され、そして高真空チャンバへ押し流される。高真空チャンバの離れた端部にて、この加速されたイオンは異なる時間で高感度検出で表面にぶつかる。飛行時間はイオンの質量の関数であるので、イオン形成とイオン検出器衝突との間の経過した時間は、特定の質量電荷比の分子の存在または非存在を同定するために使用され得る。当業者が理解するように、レーザー脱着飛行時間質量分析計の任意のこれらの構成要素は、質量分析計のアセンブリにおいて本明細書中で記載される他の構成要素と組み合わせられ得、この質量分析計は、脱着、加速、検出、時間の測定などの種々の手段を使用する。

【0069】典型的なレーザー脱着質量分析計は、337.1nmにて窒素レーザーを使用し得る。有用なパルス幅は、4ナノ秒である。一般的に、約1~25μJの出力が使用される。

【0070】別の実施態様において、イオン移動度分析計は、分析物を検出および特徴づけするために使用され得る。イオン移動度分析法の原理は、イオンの異なる移動度に基づいている。具体的には、イオン化によって生成された試料のイオンは、電場の影響下で気体を含むチューブを通して、異なる速度（その差異（例えば、質量、電荷、または形状）に起因して）で移動する。このイオン（典型的には電流の形態で）は、検出器で登録され、次いで、これらは試料の分析物または他の物質を同定するために使用され得る。イオン移動度分析法の1つの利点は、大気圧で操作し得ることである。

【0071】また別の実施態様において、全イオン電流測定装置が、分析物を検出および特徴づけするために使用され得る。この装置は、プローブが単一型の分析物のみを結合する表面化学物質を有する場合に使用され得る。単一型の分析物がプローブに結合する場合、イオン化した分析物から発生した全電流は、分析物の性質を反映する。次いで、分析物によって生成された全イオン電流は、公知の化合物の保存された全イオン電流と比較され得る。次いで、この分析物の特徴が決定され得る。

【0072】(B. データ分析) 分析物の脱着および検出から生じるデータを、プログラム可能なデジタルコンピュータを用いて分析し得る。このコンピュータプログラムは一般に、コードを保存する読み取り可能な媒体を含む。プローブ上の各々の性質の配置、その性質における吸着剤の同一質、およびその吸着剤を洗浄するのに用

いる溶離条件を含むメモリに対して、一定のコードが与えられ得る。この情報を用いて、このプログラムは次いで、一定の選択性の特性（例えば、使用する吸着剤および溶離液（eluant）のタイプ）を規定するプローブ上の性質のセットを同定し得る。このコンピュータはまた、入力として受容するコード、プローブ上の特定のアドレス可能な位置から受容した様々な分子量におけるシグナルの強度のデータを含む。このデータは、検出された分析物の数（必要に応じて、検出された各々の分析物について、シグナル強度および決定された分子量を含む）を示し得る。

【0073】データ分析は、検出された分析物のシグナル強度（例えば、ピークの高さ）を決定する工程、および「外部にあるもの」（所定の統計分布から逸脱したデータ）を除去する工程を包含する。例えば、観察されたピークは規格化され得、プロセスはこれによって何らかの参照に対する各々のピークの高さが計算される。例えば、参照は、器具および化学物質（例えば、エネルギーを吸収する分子）により生じるバックグラウンドノイズであり得、これをそのスケールにおいてはゼロに設定する。次いで、各々の分析物または他の基質について検出されたシグナル強度を、相対強度の形態で、所望のスケール（例えば、100）で表示し得る。あるいは、標準がサンプルとともに収容され得、これによってその標準からのピークを参照として用いて、各々の分析物または他の検出された分析物について観察されたシグナルの相対強度を計算し得る。

【0074】このコンピュータは、結果として得られたデータを、表示用の様々なフォーマットに変換し得る。あるフォーマットにおいては、「スペクトル図またはリテンテート（retentate）マップ」と呼ばれるが、標準的なスペクトル図が表示され得、ここでその図は、各々の特定の分子量において検出器に到達する分析物の量を示す。別のフォーマットにおいては、「ピークマップ」と呼ばれるが、ピーク高さおよび質量の情報のみがスペクトル図から維持され、より鮮明な画像を与え、ほぼ同一の分子量の分析物が、より容易に見られるようにする。さらに別のフォーマットにおいては、「ゲル図」と呼ばれるが、ピーク図からの各々の質量が変換されて各々のピークの高さに基づいたグレースケール画像となり、結果として電気泳動ゲルにおけるバンドと類似の外観となる。さらに別のフォーマットにおいては、「3-Dオーバーレイ」と呼ばれるが、いくつかのスペクトルが重ねられ得、これによって相対的ピーク高さにおける微妙な変化を研究し得る。さらに別のフォーマットにおいては、「差異（difference）マップ図」と呼ばれるが、2つまたはそれ以上のスペクトルが比較され得、固有の分析物、および試料間で上方、または下方に調節された分析物を、好都合に表示（highlight）する。任意の2つの試料からの分析物プロ

ファイル（スペクトル）を視覚的に比較し得る。

【0075】（V. 実施例－ウシ血清中のマーカー（西洋ワサビペロキシダーゼ）の検出）異なった個体の血清試料中のタンパク質を、異なった様式で表現し得る。プロテインチップ技術をタンパク質分別法と共に用いて、これらの試料中で上方に調節または下方に調節したタンパク質を検出する。

【0076】実験には、ウシ血清に低濃度（0.5%全タンパク質未満）においてタンパク質マーカー（西洋ワサビペロキシダーゼ－HRP）を添加したものおよび添加しないものをプロファイリングに用いた。タンパク質分別前のこれら2つの試料のプロファイルと比較して、HRPを検出した。図2の上の2つのトレースを参照のこと。

【0077】これら2つの試料を、K30サイズ選択（これは、15kDより低いタンパク質を30kDより高いものから分離する）スピンカラムで、次いでQ－アニオン交換体（強いアニオン交換体）スピンカラムで、分別する。これらのスピンカラムはいずれも、Cipha 20  
ergen Biosystems, Inc. から入手可能である。類似の機能を果たすスピンカラムは当該分野において周知であり、他の製造元から市販されている。カラムフラクション中のタンパク質をプロファイルして、HRPを検出する。図2の下の方の2つのトレースが、この結果を示す。プロトコルは実質的に、以下に述べる通りである。

【0078】（A. K30サイズ選択スピンカラムによるタンパク質分別）5M NaClおよび1% Triton ストックを用いて、血清または溶解物（約5mg/ml タンパク質またはそれより高い）を、0.4M NaCl 30  
および0.01%（v/v）Triton X-100を有するように調節する。元の試料の約10%希釈が理想的である。よく混合して冷蔵で20分間インキュベートする。

【0079】30μLの試料のアリコートで、20mM Tris-HCl 中でpH9.0の平衡状態にしたサイズ排除スピンカラムに適用する。続くプロトコルをサイズ選択スピンカラムのために追跡する。

【0080】（1. 貯蔵緩衝液交換）

1. スピンカラムのアウトレットキャップを壊す。このカラムを1.5－ml管（2－ml管がなお良い）に挿入する。

【0081】2. そのスピンカラムの頂部キャップを開ける。貯蔵緩衝液を重力によって管内へと流入させる。貯蔵緩衝液が容易に落下しない場合は、硬い面上でカラムおよび管ユニットを数回たたか、または3000rpmで数秒間遠心器にかける。

【0082】3. さらに滴が出て来なくなるまで、貯蔵緩衝液（例えば、PBS）を重力によって排出する。その管を空にする。

【0083】4. 約0.75mlの所望の緩衝液（例えば、20mM Tris-HCl（pH9.0））をそのカラムに適用し、それを重力によってカラムマトリックスを通じて流す。この工程をさらに2回繰り返して、少なくともカラム体積の3倍の新しい緩衝液が通過するようにする。

【0084】（2. タンパク質精製プロトコル）

1. スピンカラムのアウトレットキャップを壊す。そのカラムを1.5－ml管（2－ml管がなお良い）に挿入する。そのスピンカラムの頂部キャップを開ける。

【0085】2. そのスピンカラムを約700×g（約3000rpm）で3分間、桌上遠心分離器中で遠心分離する。管内に溶出した貯蔵緩衝液がそのカラムの出口端に触れるならば、その管を空にしてこの遠心分離工程をもう1度繰り返す。カラムマトリックスを下方に充填して半乾燥させなければならないが、割るべきではない。

【0086】3. そのスピンカラムを新しい1.5－ml管に移す（または第一の管から貯蔵緩衝液を完全に空にする）。20～30μlのタンパク質試料をその充填したカラムマトリックスの中心にゆっくりと適用し、その試料をそのカラムマトリックスの側部に流してはならない。

【0087】4. 約700×gで3分間遠心分離する。精製したタンパク質を回収管に入れる。

【0088】5. 任意：連続するフラクション中で次第に少なくなるタンパク質を回収するために、上記2工程を、25μlアリコートの緩衝液を適用して繰り返す。

【0089】6. カラムを新たな管に移動し、30μLの20mM Tris-HCl（pH9.0）を適用する。4つのフラクションの合計である30μLを、カラムで平衡化された緩衝液を用いて各試料ごとに回収した。

【0090】（B. Qアニオン交換体スピンカラムによるタンパク質分別）K30カラムのフラクション1および2を合わせる。20mM Tris-HCl（pH9.0）を用いてその体積を100μLに調節する。よく混合して冷蔵で5分間インキュベートする。

【0091】100μLの試料を、20mM Tris-HCl（pH9.0）中で平衡化された強アニオン交換体スピンカラム（例えば、Cipha 20  
ergen Biosystems, Inc. からの「Q」カラム）に適用する。強アニオン交換体スピンカラムのために、そのプロトコルを追跡する：

（1. 貯蔵緩衝液交換）

1. スピンカラムのアウトレットキャップを壊す。そのカラムを1.5－ml管（2－ml管がなお良い）に挿入する。

【0092】2. そのスピンカラムの頂部キャップを開く。貯蔵緩衝液をその管に重力によって流入させる。貯

蔵緩衝液が容易には落下しないならば、そのカラムおよび管ユニットを硬い表面上で数回たたか、または1000rpmで約20秒間、遠心分離する。

【0093】3. さらに滴が出て来なくなるまで、貯蔵緩衝液を重力によって排出させる。その管内の緩衝液を空にする。

【0094】4. 約0.5mlの所望の結合緩衝液をそのカラムに適用し、それを重力によってカラムマトリックスを通過させる。この工程をさらに2回繰り返して、カラム体積の少なくとも10倍の新しい緩衝液がその樹脂を通過するようにする。

【0095】(2. タンパク質分別/精製プロトコル)  
(a. タンパク質試料の精製)

1. タンパク質試料を、アニオン交換体スピンカラムの平衡化に用いたものと同じ緩衝液条件にしなければならない。

【0096】2. 試料が高度の塩または過度に緩衝したpH(結合緩衝液と異なる)を含むならば、その結合緩衝液によって平衡化されたサイズ選択スピンカラム(K-3またはK-30)上で、これらをまず緩衝液交換しなければならない。

【0097】3. 試料が結合緩衝液と類似の緩衝液条件ならば、次いでそれらの試料を、その結合緩衝液を用いて、10倍(10×)に希釈し得る。

【0098】(b. Qアニオン交換体スピンカラム上でのタンパク質分別)

1. スピンカラムの出口キャップを壊す。そのカラムを1.5ml管(2ml管がなお良い)に挿入する。そのスピンカラムの頂部キャップを開く。

【0099】2. そのスピンカラムを1000rpm(約80×g)で20秒間~1分間、卓上遠心分離器で遠心分離する。そのカラムマトリックスを下方に充填して、半乾燥しなければならないが、割るべきではない。

【0100】3. そのスピンカラムを新しい1.5ml管に移す(または、貯蔵緩衝液をその第一の管から完全に空にする)。20~500μlのタンパク質試料(結合緩衝液中で調節された)を、その充填されたカラムマトリックスの頂部中心に適用し、数分間、またはさらに滴がカラムから出て来なくなるまで、その試料を重力によってそのアニオン交換樹脂を通過させる。

【0101】4. 1000rpmで1分間遠心分離する。この第一の回収管内に回収されたタンパク質(フラクション番号1)はそのカラムに結合しない。なぜなら、この結合緩衝液条件では、これらは中性であるかまたは正の正味の電荷を有するか、あるいはカラムから流出する能力があり得るからである。

【0102】5. 任意: タンパク質のアニオン交換樹脂上への捕獲を最大化するために、溶離液をそのカラムに再び適用して、最後の2工程に続き得る。

【0103】6. そのカラムを第二の管に移動する。そ

のカラムを100μlの結合緩衝液で洗浄する。1000rpmで1分間遠心分離する。フラクション番号2を蓄える。

【0104】7. そのカラムを第三の管に移動する。100~200μlの溶離緩衝液Aを適用し、約1分間放置する。1000rpmで1分間遠心分離する。フラクション番号3を蓄える。

【0105】8. そのカラムを第四の管に移動する。100~200μlの溶離緩衝液Bを適用し、約1分間放置する。1000rpmで1分間遠心分離する。フラクション番号4を蓄える。

【0106】9. このプロセスを続く溶離緩衝液について続ける。

【0107】10. これらのフラクション中のタンパク質を次いで、SELDI™PBS読み取り装置によって、疎水性H4または順相のアレイを用いて、プロファイルする。

【0108】溶離緩衝液は典型的に、緩衝液(例えば、Tris、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム)、緩衝液強度(例えば、20mM~50mM)に従って変化する。有用な緩衝液は、20~50mM Tris、塩濃度およびpHを含む。

【0109】そのカラムを1000rpmで1分間遠心分離する。同じカラムに流れを再び適用して、タンパク質の結合を最大化する。そのカラムを1000rpmで1分間、遠心分離する。これは、pH9のフラクションである。

【0110】カラムを新しい管に移動し、100μLの20mM Tris-HCl(pH9.0)をそのカラム樹脂に適用する。そのカラムを1000rpmで1分間遠心分離する。これはpH9洗浄フラクションである。これをpH9フラクションと合わせ得る。

【0111】カラムを新しい管に移動し、100μLの20mM Tris-HCl(pH8.0)をそのカラム樹脂に適用する。カラム頂部におけるいくつかの圧力を緩衝液がその樹脂を通じてゆっくりと移動するように適用して、室温にて5分間インキュベートする。そのカラムを1000rpmで1分間遠心分離する。これはpH8フラクションである。

【0112】他の溶離緩衝液(より低いpH)について、番号8の工程を繰り返す。

【0113】(C. SELDIチップ上のタンパク質) Ciphergen Biosystems, Inc. からの順相チップを、スピンカラムによって生成されたフラクションにおけるタンパク質をプロファイルするために使用した。逆相H4疎水性チップ(Ciphergen Biosystems, Inc. より入手可能)を特に、高濃度のNaClを含有するフラクションのために使用した。

【0114】各フラクションの1μlアリコートは順相



チップ上のスポットに堆積され、サンプルを約5分間室温で乾燥させた。さらなる容量の同一サンプルは、同一のスポットに適用され、そして乾燥され得る。H4チップ上に堆積されたサンプルは、乾燥させる前に、5 $\mu$ lの水で2回洗浄されるべきである。

【0115】50%アセトニトリル+0.25%TFA中の0.5 $\mu$ lの飽和シナビン酸(SPA)を各スポットに適用した。チップを室温で5分間乾燥させた。第2のアリコートである、50%アセトニトリル+0.25%TFA溶液中の0.5 $\mu$ l飽和SPAシナビン酸を適用した。

【0116】(D. データ獲得およびタンパク質プロファイル分析)各チップを、Protein Biology System 1(PBS1)読み取り器(Ciphergen Biosystems, Inc. から)によって読み取った。

【0117】自動モードを、データ収集(SELDI定量設定)のために使用した。タンパク質プロファイルの2セットを回収する(1つは低レーザー強度であり、そしてもう1つは高レーザー強度である)。

【0118】異なる溶解物からのタンパク質プロファイルを、SELDIソフトウェアを使用して比較した。差異が示されたタンパク質を検出した。

【0119】本発明は、サンプル中の生体分子分析物を分析するための、新規の材料および方法を提供する。特定の例が提供されるが、上記記載は例示であり、限定するものではない。上記の実施態様の任意の1つ以上の特徴は、本発明の任意の他の実施態様の1つ以上の特徴と、任意の様式で組み合わせられ得る。さらに、本発明の多数の改変は、本明細書を読めば当業者に明らかとなる。従って、本発明の範囲は、上記記載を参照して決定されるだけでなく、それらの等価の十分な範囲に沿って添付の特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。

【0120】本明細書中で引用されるすべての刊行物および特許書類は、各個々の刊行物または特許書類が個々に示されるようなものと同一の範囲にまで、すべての目的のためにその全体が参考として援用される。本明細書中の種々の参照の引用によって、出願人は、任意の特定の参照を本発明の「先行技術」であることを認めない。

【0121】本発明は、サンプル中の分析物を質量分析によって分析するための方法を提供する。本方法は、サ

イズ排除および/またはイオン交換クロマトグラフィーによってサンプルをあらかじめ分別する工程、質量分析プローブの表面に付着された吸着剤にサンプルを適用する工程、および分析物の吸着剤への特定のおよび非特定の吸着の両方を可能にする工程(例えば、非結合のサンプルを除去するために洗浄することなくサンプルを乾燥させることによって)を包含する。次いで、エネルギー吸収物質は乾燥されたサンプルに加えられ、そしてこのサンプルはレーザー脱着/イオン化質量分析法によって分析される。

【0122】

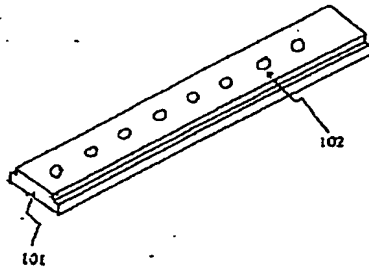
【発明の効果】本発明によって、試料中の生体分子の分析物を分離するための方法が提供される。この方法は、a) 気相イオン分光計のためのプローブを提供する工程(このプローブは、表面を有する基板および表面に結合した吸着剤を含有する); b) 試料を吸着剤に接触させ、(例えば、非結合の分析物を除去することなく試料を乾燥させることにより)吸着剤に特定のおよび非特定の双方の吸着をさせる工程; ならびに c) 試料中の分析物を表面から脱着およびイオン化する工程、ならびに脱着、イオン化された分析物を気相イオン分光計で検出する工程を包含する。本発明による方法を用いると、試料の複雑さが少なくなり、分析物の分離が改善する。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、基板101および吸着剤102の非連続スポットを包含するプローブを示す。プローブは、気相イオン分光計に取り外しできる形で装着可能である。各スポットは、分析物を脱着するためのエネルギー源によりアドレス可能である。

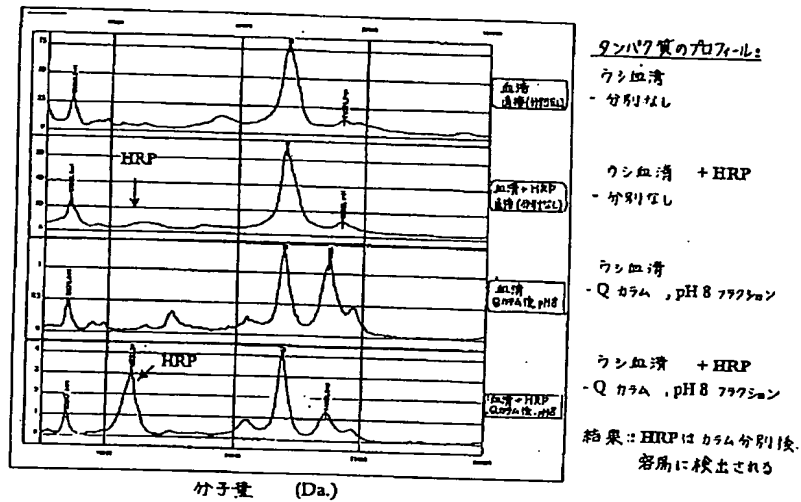
【図2】図2は、本発明の方法によりフラクションおよび検出される以前および以後双方の、2つの試料に存在する異なった微量タンパク質(西洋わさびペルオキシダーゼ)の検出を示す。ウシ血清および西洋わさびペルオキシダーゼでスパイクしたウシ血清は、最初にSELDIにより吸着剤表面に直接向けられた。上のふたつの微量タンパク質は、スパイク試料ではマーカーが検出され得ないことを示す。次いで、両試料は、サイズ排除スピンクロマトグラフィーにより、続いて強アニオン交換スピンクロマトグラフィーにより分別された。試料は、次いでSELDIにより吸着剤表面で観測された。この場合、マーカーは、スパイク試料では明白に検出され得るが、非スパイク試料では検出されない。

【図1】



【図2】

SELDI-Assisted™ タンパク質分別およびプロファイリング  
 HRPの検出(血清に添加)は、K30およびQカラム分別後のみ可能である。



フロントページの続き

(71)出願人 500164570  
 490 San Antonio Road,  
 Suite B, Palo Alto  
 o, CA 94306, United S  
 tates of America

(72)発明者 タン ティー. ファム  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94040,  
 マウンテン ビュー, リンカーン ド  
 ライブ 1101